



Contribution à l'identification des gènes impliqués dans le groupe des chondrodysplasies avec côtes courtes et polydactylie

Joyce El Hokayem

► To cite this version:

Joyce El Hokayem. Contribution à l'identification des gènes impliqués dans le groupe des chondrodysplasies avec côtes courtes et polydactylie. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T070 . tel-00805129

HAL Id: tel-00805129

<https://theses.hal.science/tel-00805129>

Submitted on 27 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES – SITE COCHIN

THESE
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ecole doctorale : Gc2iD
Discipline : Génétique Humaine

Soutenue publiquement par

Joyce EL HOKAYEM
Le 14 Novembre 2012

Contribution à l'identification des gènes impliqués dans le groupe
des chondrodysplasies avec côtes courtes et polydactylie.

Membres du Jury

Pr Hélène Dollfus.....	Présidente
Pr Valérie Cormier-Daire	Directrice de thèse
Pr Laurence Faivre.....	Rapporteur
Pr André Megarbane.....	Rapporteur
Dr Jean-Michel Rozet	Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Professeur Arnold Munnich pour m'avoir accueilli au sein de son unité.

Je voudrais exprimer ma sincère gratitude à ma directrice de thèse, le Professeur Valérie Cormier-Daire, qui a dirigé l'ensemble de ma mission avec rigueur, patience, bienveillance, et exigence, sans qui ces travaux n'auraient pas pu se dérouler. Je la remercie de m'avoir fait mieux connaître le vaste domaine de la génétique. Je la remercie de m'avoir apporté son soutien, son attention et pour ses encouragements (notamment dans les moments difficiles) pendant ces trois ans. Elle m'a aidé à évoluer et progresser sur tous les plans, scientifique et personnel.

J'exprime ma gratitude envers ma collègue Céline Huber qui a été une aide importante pendant ces 3 ans. Je lui suis grée de m'avoir formée à la biologie moléculaire, pour sa disponibilité au quotidien, sa patience et pour ses nombreux conseils techniques et scientifiques. Je tiens à lui exprimer mon profond respect et mes remerciements pour avoir pris de son temps pour relire ce manuscrit.

J'exprime ma gratitude à toute l'équipe VCD (chercheurs, ingénieurs et médecins) dont la gentillesse, la générosité, l'amitié, la confiance et les nombreux conseils m'ont été si précieux. Je tiens à remercier :

Carine Le Goff pour sa bonne humeur, sa gentillesse, son bon sens et ses conseils, sur tous les plans allant de la science aux conseils culinaires en passant par les discussions vestimentaires.

Clémentine Mahaut pour sa bonne humeur, sa joie de vivre communicative, sa gentillesse, son écoute et son dévouement. Je la remercie pour ses encouragements, pour nos discussions passionnantes et pour ses petites attentions au quotidien.

Je tiens à remercier les docteurs Geneviève Baujat et Martine le Merrer pour leurs conseils, leur disponibilité et le travail accompli ensemble.

Je remercie également Laurence Legeai-Mallet, Catherine Benoit et Nabil Kaci qui font partie de la deuxième moitié de notre équipe, pour leur gentillesse, leur soutien et le café du matin. Je veux remercier Emilie Mugniery et Aurélie Jonquoy, anciennes doctorantes pour leurs conseils, leur écoute et encouragements, même à distance.

Je remercie l'équipe Œil d'avoir partagé sa machine à café NESPRESSO, gage d'énergie matinale, et d'efficacité. Je remercie ses membres pour leur bonne humeur, leur générosité, leurs conseils et leur gentillesse.

J'exprime ensuite ma gratitude aux différents membres de mon jury de thèse :

Le professeur Hélène Dollfus pour avoir accepté de présider ma thèse.

Le directeur de recherche Jean-Michel Rozet pour avoir eu la gentillesse d'accepter de juger ce travail en tant qu'examineur. Je le remercie pour son amabilité et ses conseils.

Mes deux rapporteurs, le professeur Laurence Faivre et le professeur André Megarbane d'avoir eu la gentillesse de se pencher sur mes travaux de thèse malgré leurs emplois du temps chargés.

Je tiens à remercier le personnel de la banque d'ADN, et les membres de la plateforme génomique et bioinformatique pour leur disponibilité, leur gentillesse et pour avoir répondu à toutes mes questions. Un grand merci à Christine Bole pour le temps qu'elle m'a accordé, pour ses explications très fructueuses sur le séquençage à haut débit. Un grand merci à Mohammed pour son dévouement, son aide et ses conseils.

Je tiens à remercier les différents membres du PHRC « DTJ » qui ont aidé à la réalisation d'une partie de ce travail et de mon financement. J'ai apprécié leur gentillesse et leur efficacité : Dr Kim Hanh Le Quan Sang, Mesdames Samia Houari, Honorine Kayirangwa et Cécile Meaulard.

Mes trois années passées au Laboratoire de génétique, Unité 781 m'ont permis de rencontrer des personnalités riches et diverses qui m'ont aidé à plusieurs reprises par leur soutien quotidien et leurs discussions enrichissantes.

Je remercie tous les doctorants du laboratoire (Oriane, Lucas, Simonetta, Giulia, Maeva et Marine) pour leurs conseils, les discussions et pour les moments plus légers que j'ai partagés avec chacun d'entre eux.

Je n'oublie pas mon amie Nawel Toumi pour les moments agréables et inoubliables passés ensemble. Je remercie aussi Vanessa Vedrenne, Zahra, Valérie Serre et Laurence Hubert pour leurs conseils, leur amabilité et leur écoute.

Je remercie Anna Pellet et Sylvie Gerber pour leurs conseils concernant les commandes, la thermo-scelleuse, les plaques PCR et autres. Je remercie aussi Anna pour nous avoir cultivés avec les journaux très élaborés : 20 minutes, Direct Matin et Métro. Je tiens à remercier Alexandra Henrion pour ses conseils et le temps qu'elle m'a accordé pour me sensibiliser à la base de données des micro-RNA. Un grand

merci à toutes les équipes ainsi que toutes les secrétaires de l'Unité 781.

Je remercie de tout cœur Sylvain Hanein pour son amitié, sa gentillesse, son écoute, les sympathiques déjeuners (surtout nos sushis party les vendredis). Je le remercie pour ses conseils, son soutien et ses mots qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant.

Je remercie tout particulièrement Romain. Je lui dois beaucoup. Sans lui, j'aurais sans doute abandonné. Son soutien, sa patience et sa foi en moi m'ont été un bien précieux. Merci à lui d'exister.

Pour finir, je remercie mes amis et ma famille de m'avoir aidé et soutenu souvent de loin. Je pense en particulier à mes parents, car ce fut pour eux parfois un peu difficile d'accepter mes choix. Merci à ma maman pour ses multiples attentions, ses mots doux, ses petits plats envoyés au dessus de la méditerranée. Merci à mon père notamment pour les derniers mois qui nous ont rapprochés. Merci à ma tata Rima pour ses encouragements bien qu'elle soit éloignée et occupée, elle a toujours trouvé le temps de m'encourager et de choisir les mots adéquats pour me pousser vers l'avant.

Je prie les personnes que j'aurais pu oublier de m'excuser. La liste est très longue.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	11
A. LES CILS	11
1. Structure du Cil.....	11
2. Le transport intraflagellaire (IFT).....	16
3. Fonctions du cil primaire	18
B. LES CILIOPATHIES	20
1. Généralités	20
2. CCP létales	22
a. CCP de type I ou syndrome de Saldino-Noonan.....	22
b. CCP de type II ou syndrome de Majewski.....	23
c. CCP de type III ou syndrome de Verma-Naumoff	24
d. CCP de type IV ou syndrome de Beemer-Langer	25
e. CCP de type V	26
3. CCP compatible avec la vie.....	26
a. La DTJ	26
b. L'EVC	28
c. Le syndrome de Sensenbrenner	29
d. Le syndrome de Saldino-Mainzer	30
4. Fonction des protéines ciliaires identifiées à ce jour dans les CCP.....	31
a. Protéines ciliaires du corps basal.....	31
b. Protéines ciliaires du moteur à dynéines	32
c. Protéines ciliaires du complexe IFT	33
i. Complexe IFT-B	33
ii. Complexe IFT-A	33
II. OBJECTIFS DE MA THESE.....	36
III. MATERIELS ET METHODES.....	37
1. Données cliniques des patients DTJ du PHRC national	37
2. Données cliniques des familles atteintes de la DTJ, non liées à DYNC2H1 ou IFT80: famille N et famille A..	38
a. Famille N	38
b. Famille A.....	39
3. Données cliniques des familles atteintes de CCP de type II (Majewski) et de type IV (Beemer-Langer).....	40
4. Extraction d'ADN à partir de sang.....	41
5. Extraction d'ADN à partir de tissu.....	42
6. Dosage des ADN	42
7. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	43
8. Séquençage direct automatisé	44
9. Cartographie par homozygotie et analyse de liaisons génétiques.....	46
10. Génotypage par étude des marqueurs microsatellites.....	47
11. Nouvelles stratégies diagnostiques utilisant le séquençage à haut :	48
a. Design des sondes de capture pour exome ciliaire et exome	48
b. Préparation des banques d'ADN.....	49

c.	<i>Capture par hybridation en phase liquide</i>	49
d.	<i>Séquençage de nouvelle génération</i>	50
➤	Etapes 1 et 2: Amplification clonale sur billes par PCR en émulsion et enrichissement des billes.	51
➤	Etape 3 : Réaction de séquence	52
~	Etape 1 : Amorçage de la ligation à partir de la position (n).....	53
~	Etape 2 : Amorçage de la ligation à partir de la position (n-1).....	53
IV.	RESULTATS	56
1.	Etudes cliniques et moléculaires des patients atteints de la Dystrophie Thoracique de Jeune et corrélation génotype-phénotype.....	56
	(Article 1).....	56
2.	Etudes moléculaires des deux familles atteintes de la Dystrophie Thoracique de Jeune, non liées à DYNC2H1 et IFT80	76
a.	<i>Famille N</i>	76
i.	Tour de génome sur puce Affymetrix 250K.....	76
ii.	Haplotype par marqueurs microsatellites	77
iii.	Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 11	78
iv.	Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 14	79
v.	Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 17	80
vi.	Séquençage de gènes candidats dans la famille N	81
➤	Région d'homozygotie sur le chromosome 14q31.3-14q32.11	81
➤	Région d'homozygotie sur le chromosome 17q23.2-17q24.2.....	82
vii.	Séquençage par exome ciliaire dans la famille N.....	83
viii.	Séquençage par exome dans la famille N	84
b.	<i>Famille A</i>	85
i.	Tour de génome sur puce Affymetrix 250K.....	85
ii.	Haplotype par marqueurs microsatellites	86
iii.	Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 3	87
iv.	Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 8	88
v.	Séquençage de gènes candidats dans la famille A	89
➤	Région d'homozygotie sur le chromosome 8p22-8p21.2	89
➤	Région d'homozygotie sur le chromosome 3q29	89
3.	Bases moléculaires du syndrome de Majewski (CCP type II) / Beemer-Langer (CCP type IV)	90
V.	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	92
1.	<i>CCP et variabilité clinique d'un même spectre mutationnel : l'exemple du gène DYNC2H1</i>	94
a.	La DTJ	94
b.	Des mutations dans DYNC2H1 ont été identifiées dans les CCP de type II	95
2.	<i>L'hétérogénéité génétique</i>	98
3.	<i>Identification de nouveaux gènes et difficultés</i>	102
VI.	BIBLIOGRAPHIE	107

TABLE DES ILLUSTRATIONS

(FIGURES et TABLEAUX)

FIGURE 1 : L'ARCHITECTURE EXTERNE DU CIL.....	12
FIGURE 2 : L'ARCHITECTURE INTERNE DU CIL.....	13
FIGURE 3 : CYCLE CIL-CENTRIOLE-CENTROSOME.....	14
FIGURE 4 : STRUCTURE DU CIL ET TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE.....	16
FIGURE 5 : VOIE DE SIGNALISATION HH CHEZ LES MAMMIFERES.....	18
FIGURE 6 : ORGANES ATTEINTS DANS LES CILIOPATHIES HUMAINES.....	20
FIGURE 7 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP DE TYPE I.....	21
FIGURE 8 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP DE TYPE II.....	22
FIGURE 9 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP DE TYPE III.....	23
FIGURE 10 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP TYPE IV.....	24
FIGURE 11 : MANIFESTATIONS CLINIQUES RADIOLOGIQUE DE LA DTJ.....	26
FIGURE 12: MANIFESTATIONS CLINIQUES D'EVC.....	27
FIGURE 13 : COMPARAISONS RADIOLOGIQUES ENTRE SENSENBRENNER (A), DTJ (B) ET EVC (C).....	28
FIGURE 14 : LE SYNDROME DE SILDINO-MAINZER.....	29
FIGURE 15 : ARBRE GENEALOGIQUE DE LA FAMILLE N D'ORIGINE YEMENITE...36	
FIGURE 16 : ARBRE GENEALOGIQUE DE LA FAMILLE A D'ORIGINE TURQUE.....37	
FIGURE 17 : PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE SURESELECT D'AGILENT48	
FIGURE 18 : ENCODAGE DE QUATRE COULEURS DES DIMERES DE BASES UTILISE POUR LE SEQUENÇAGE SOLiD™.....	50
FIGURE 19 : PRINCIPE DE LIGATION ET CLIVAGE EN CHAINE DE LA TECHNOLOGIE SOLiD™ (SEQUENÇAGE DE 35 BASES).....	52
FIGURE 20 : DIFFERENTES BASES INTERROGEES POUR CHAQUE PRIMER ET LIGATION POUR UN FRAGMENT DE 35 BP.....	53
FIGURE 21 : RECONSTITUTION DE LA SEQUENCE EN BASE A PARTIR DU CODE COULEUR.....	53
FIGURE 22 : RESULTATS DE L'ETUDE DE LIAISON DE GENOME ENTIER SUR PUCE AFFYMETRIX 250K DANS LA FAMILLE N.....	74

FIGURE 23 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 11 DE LA FAMILLE N.....	76
FIGURE 24 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION D’HOMOZYGOTIE MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 14 DE LA FAMILLE N....	77
FIGURE 25 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 17 DANS LA FAMILLE N.....	78
FIGURE 26 : GENES CANDIDATS PAR LEURS FONCTIONS ET LEURS LOCALISATIONS (CGROMOSOME 14).....	79
FIGURE 27 : GENES CANDIDATS PAR LEURS FONCTIONS ET LEURS LOCALISATIONS (CHROMOSOME 17).....	80
FIGURE 28 : RESULTATS DE L’ETUDE DE LIAISON DE GENOME ENTIER SUR PUCES AFFYMETRIX 250K DANS LA FAMILLE A.....	83
FIGURE 29 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION D’HOMOZYGOTIE MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 3 DE LA FAMILLE A.....	85
FIGURE 30 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION D’HOMOZYGOTIE MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 8 DE LA FAMILLE A.....	86
FIGURE 31 : GENES CANDIDATS PAR LEURS FONCTIONS ET LEURS LOCALISATIONS (CHROMOSOME 8).....	87
FIGURE 32 : DIFFERENTS PHENOTYPES CILIAIRES ASSOCIES A PLUSIEURS EXEMPLES DE CILIOPATHIES.....	91
TABLE 1 : MANIFESTATIONS CLINIQUES ET RADIOLOGIQUES DES ENFANTS ATTEINTS DE LA FAMILLE A.....	38
TABLE 2 : LES VARIATIONS HOMOZYGOTES IDENTIFIEES PAR SEQUENÇAGE PAR EXOME CILIAIRE.....	82

LISTE DES ABREVIATIONS

Alamut : Regroupe 3 différents sites de prédiction de mutations : PolyPhen, SIFT, AlignGVGD

ALS : Syndrome d'Alström

CCP : Côtes Courtes-Polydactylie

CGH array : Array comparative genomic hybridization,

CiDB : Cilia Data Base

cM : Centimorgan

Dhh : Desert hedgehog

dNTP / ddNTP : Désoxynucléotide / Di-Désoxynucléotides

DTJ : Dystrophie Thoracique de Jeune

DYNC2H1 : Dynein Cytoplasmic Chain 2 Heavy 1

EVC : Ellis Van Creveld

Gli3 A/R : Facteur de transcription du glioblastome activé/réprimé

Hh : Hedgehog

IFT : Intraflagellar transport

Ihh : Indian hedgehog

JBTS : Syndrome de Joubert

KIF7 : Kinesin Family Member 7

Mb : Mégabase

NEK1 : Never In Mitosis Gene A

NPHP : Néphronophtise

NLS : Nuclear Localization Signal

NES : Nuclear Localization Signal

OFD : syndrome Oro-facio-digital

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PKS : Polykystose rénale

PTCH1 : Patched, récepteur du ligand Hh

RPE1 : Retinal Pigment Epithelial cell line

SD : Standard Deviation

Shh : Sonic hedgehog

Smo : Smoothed

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSM : Syndrome de Saldino-Mainzer

Su(Fu) : Suppresseur de Fused

TCTN3 : Tectonic Family Member 3

TTC : Tetratricopeptide Repeat domain, motifs structuraux (l'assemblage du complexe protéique)

WDR : WD repeat protein family. Facilite la formation du complexe protéique

Wnt : Regroupe Wg et Int (Wingless et Integration Site), gène wingless impliqué dans la morphogenèse chez *D. Melanogaster*

I. INTRODUCTION

A. LES CILS

1. Structure du Cil

Les cils ou les flagelles forment des extensions cellulaires pouvant mesurer jusqu'à 10 μm de long pour un diamètre de 250 nm (Figure 1). Ces organites sont bien conservés et présents dans les organismes uni- ou pluri- cellulaires (de l'algue verte *Chlamydomonas* jusqu'à l'Homme). C'est à la fin du XVII^{ème} siècle que Leeuwenhoek rapporte la première observation de flagelles de protozoaires (Satir, 1995). En 1898, Karl Wilhelm Zimmermann décrit pour la première fois la présence d'un cil à la surface des cellules de mammifère. La distinction entre les deux termes, flagelle et cil, est essentiellement historique car ces organites présentent la même architecture.

Le cil est caractérisé par un squelette microtubulaire appelé axonème. Il existe deux types de cils : les cils motiles et les cils primaires ou sensoriels. Les cils motiles sont présents par centaines au niveau des cellules épithéliales bronchiques et du nœud embryonnaire. Ils sont caractérisés par une structure axonémale dite en « 9+2 », c'est à dire avec 9 doublets de microtubules périphériques entourant une paire centrale de microtubules. Des protéines indispensables à la motilité ciliaire comme les fibres rayonnantes, ou les dynéines axonémales sont également présentes. Les cils primaires ou sensoriels sont, eux, caractérisés par l'absence de la paire centrale de microtubules, on parle alors de structure en « 9+0 » (Figure 2). Contrairement aux cils motiles, on ne distingue qu'un seul cil primaire à la surface des cellules telles que les neurones (Handel et al., 1999; Mandl and Megele, 1989), les chondrocytes (Jensen et al., 2004), l'ectoderme des bourgeons de membre et des cellules mésenchymateuses (Haycraft et al., 2005), les cellules épendymaires des ventricules du cerveau (Cathcart and Worthington, 1964), les cellules épithéliales des tubules rénaux (Pazour et al., 2000), les cellules des îlots et voies pancréatiques (Aughstee, 2001; Yamamoto and Kataoka, 1986) et les cellules hépatiques (Tobe et al., 1985). Les cils primaires sont ancrés dans la cellule au niveau de leur corps basal composé du centriole mère, d'un assemblage de 9 triplets de microtubules périphériques, et de matériel péricentriolaire. Les cils sont des structures post-mitotiques, initiées au cours de la

phase G1 du cycle cellulaire. Le centriole mère présente deux structures de neufs appendices appelés

appendices distaux et subdistaux, permettant la formation des fibres de transition et l'ancrage des microtubules respectivement (Figure 2) (Pan and Snell, 2007). En fin de phase G2/M, ils sont résorbés afin de permettre la libération du centriole mère du corps basal, essentiel à la formation du centrosome et du fuseau mitotique lors de la division cellulaire (Figure 3).

La croissance des cils a lieu au niveau de leur extrémité distale, par l'assemblage de tubulines et des protéines qui leur sont associées. Ces protéines ciliaires, synthétisées dans le cytoplasme, sont acheminées le long des microtubules externes du cil par un transport actif appelé transport intraflagellaire (IFT) (Figure 4) (Pan and Snell, 2007), (Bisgrove and Yost, 2006; Satir and Christensen, 2007).



FIGURE 1 : L'ARCHITECTURE EXTERNE DU CIL

Microscopie électronique du cil primaire dans les cellules RPE1 (retinal pigment epithelial 1)
D'après (Ishikawa and Marshall, 2011)

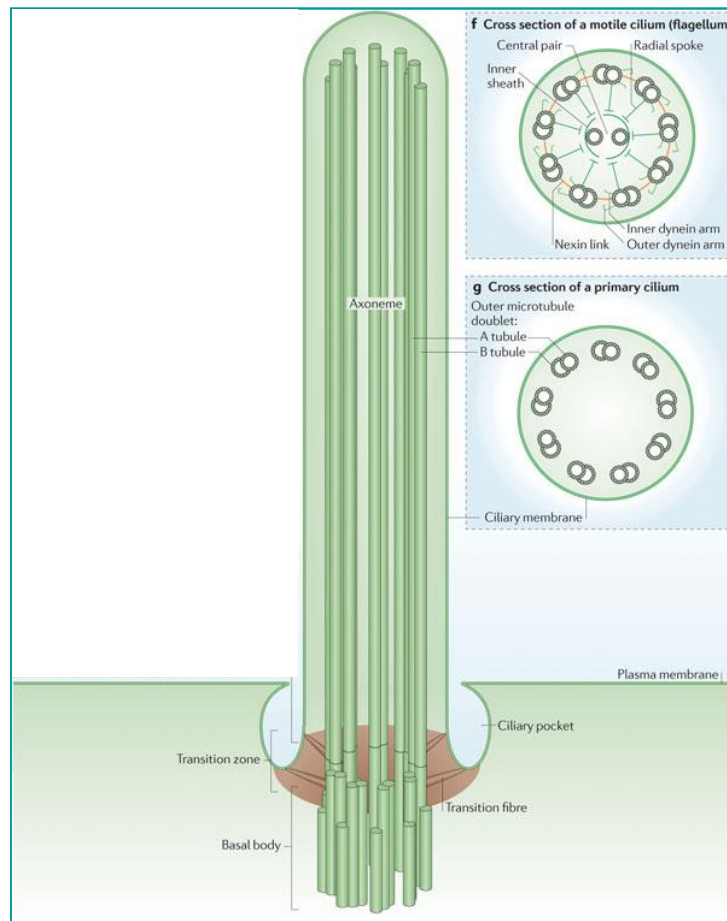


FIGURE 2 : L'ARCHITECTURE INTERNE DU CIL

Schéma du cil primaire avec une coupe transversale du cil motile «9+2» et du cil sensoriel «9+0». D'après (Ishikawa and Marshall, 2011)

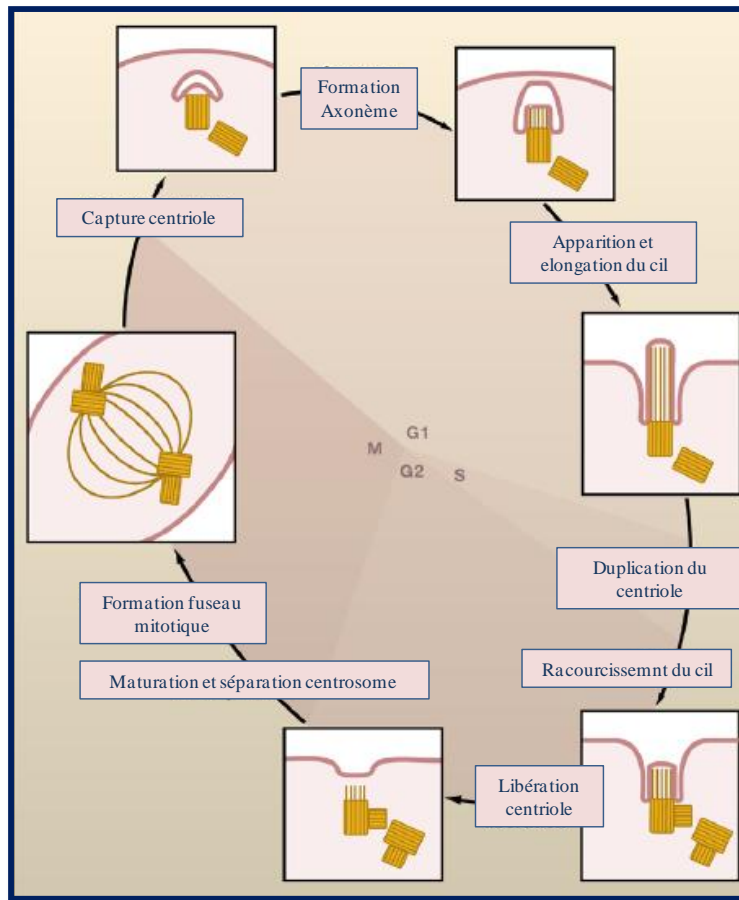


FIGURE 3 : CYCLE CIL-CENTRIOLE-CENTROSOME

La formation du cil primaire débute au cours de la phase G1/G0 grâce à la position du centriole mère au niveau du site d'assemblage ciliaire et de la membrane plasmique apicale. L'élongation ciliaire est assurée par les protéines IFT permettant l'ajout de précurseurs ciliaires au niveau de l'extrémité distale du centriole mère. La résorption du cil se fait avant l'entrée en mitose et permet aux deux centrioles de participer à la formation du fuseau mitotique Modifiée de (Pan and Snell, 2007).

2. Le transport intraflagellaire (IFT)

Le transport intraflagellaire (IFT) est un phénomène conservé dans toutes les cellules/organismes ciliés et a été mis en évidence pour la première fois au niveau du flagelle de *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1995). L'IFT est un transport bidirectionnel qui permet l'acheminement des composants ciliaires de la base du cil à sa partie distale via un transport antérograde, tandis que leur recyclage vers le corps basal est assuré par un transport rétrograde (Figure 3). Le transport antérograde est réalisé par un moteur kinésine II hétérotrimérique, formé de KIF3A, KIF3B et KAP3, associé au complexe B (IFT-B). En revanche, le transport rétrograde est assuré par un moteur dynéine, formé par DYNC2H1 et DYNC2L1, associé au complexe A (IFT-A) (Cole, 2003; Cole and Snell, 2009; Piperno et al., 1998). Le complexe B est composé d'au moins 14 protéines (IFT172, IFT88, IFT81, IFT80, IFT74, IFT70, IFT57, IFT54, IFT52, IFT46, IFT27, IFT25, IFT22 et IFT20) et le complexe A en compte au moins six (IFT144, IFT140, IFT139, IFT122, IFT121 et IFT43). Au final, les particules IFT des complexes B et A assurent la formation et le maintien du cil, mais il semblerait qu'elles permettent aussi la transduction de signaux à travers le cil (Figure 4) (Bisgrove and Yost, 2006; Goetz and Anderson, 2010; Sasindran et al., 2007; Scholey and Anderson, 2006; Veland et al., 2009; Wemmer and Marshall, 2007).

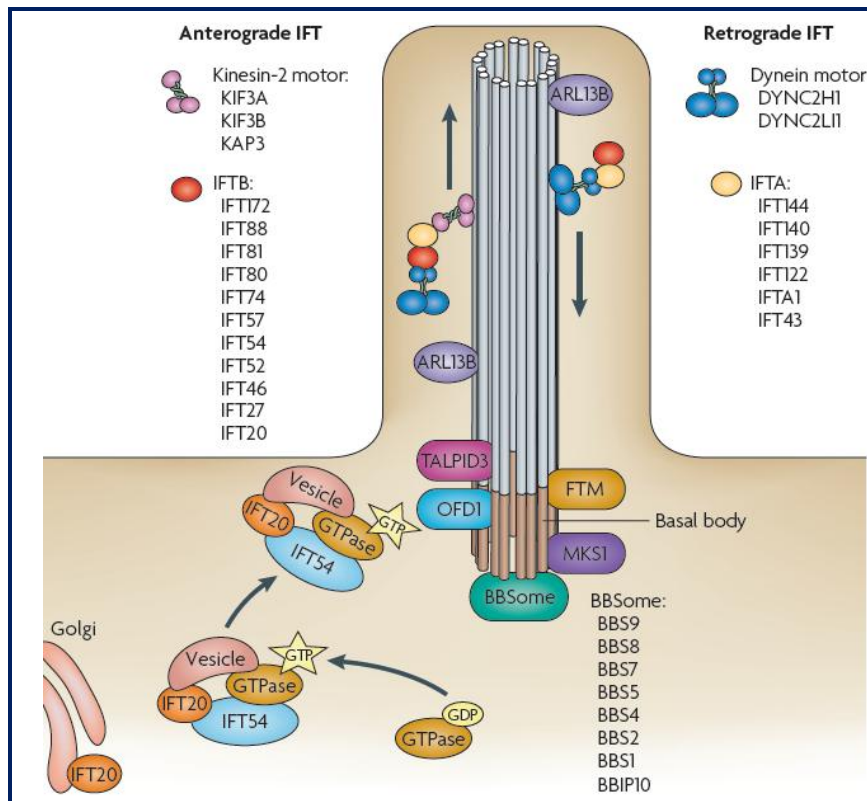


FIGURE 4 : STRUCTURE DU CIL ET TRANSPORT INTRAFLAGELLAIRE

Les protéines sont transportées le long de l'axonème du cil depuis sa base jusqu'à sa partie distale via un transport antérograde assuré par un complexe moteur kinésine II - IFTB. Tandis que le complexe moteur dynéine - IFTA assure le recyclage des protéines du sommet du cil jusqu'à sa base via un transport rétrograde. Les protéines du complexe B, IFT20 et IFT54 participent aussi au transport des vésicules membranaires de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane ciliaire. Tandis que le complexe BBSome (nom lié au syndrome de Bardet-Biedl) interviendrait dans le chargement des protéines ciliaire au niveau de la zone de transition de l'axonème. Il existe d'autres protéines associées au corps basal telles que MKS1 (lié au syndrome de Meckel), fantom (FTM connu également sous le nom de RPGRIP1L), OFD1 (lié au syndrome oro-facio digital) et TALPID3 (chicken talpid3 mutant), nécessaire à la formation du cil. D'après (Goetz and Anderson, 2010). BBIP10, BBSome-interacting protein de 10 kDa; KAP3, KIF-associated protein 3.

3. Fonctions du cil primaire

Au cours des 10 dernières années, des anomalies du cil ont été impliquées dans une douzaine de maladies regroupées sous le nom de ciliopathies. Dans le cadre de ma thèse je me suis intéressée à un groupe de maladies osseuses constitutionnelles appartenant aux ciliopathies et appelé Côtes Courtes - Polydactylie (CCP) ce qui m'amène à aborder ici les fonctions du cil au sein de l'ossification endochondrale.

Le cil présent à la surface des chondrocytes, cellules spécifiques du cartilage de la plaque de croissance osseuse, a longtemps été considéré comme entité négligeable. Cependant, de récentes études de microscopie électronique et à fluorescence ont montré que ce cil présentait une orientation spécifique dans le milieu extracellulaire permettant probablement l'empilement en colonnes des chondrocytes dans la zone proliférative de la plaque de croissance. La présence de récepteurs et de canaux ioniques le long de l'axonème du cil laissent également supposer un rôle de capteur mécanique, chimique et osmotique (Poole et al., 1985; Poole et al., 1997; Poole et al., 2001; Satir and Christensen, 2007). Tandis que de récents travaux tendent à démontrer un rapport entre le cil et la voie de signalisation Hedgehog qui intervient au cours de l'ossification endochondrale et plus particulièrement dans la prolifération des chondrocytes et dans le développement des bourgeons des membres, par le biais de la voie Indian hedgehog (Ihh) et de la voie Sonic hedgehog (Shh) respectivement. La voie de signalisation Hh est activée par la présence d'un ligand, Ihh ou Shh, qui se fixe sur le récepteur membranaire Patched (PTCH1) permettant ainsi l'ancrage de Smoothened (SMO) au niveau de la membrane cytoplasmique du cil et l'acheminement de Gli3R à la partie distale du cil par le moteur kinésine KIF7. Après maturation, Gli3R sera sous sa forme Gli3A reconduit par le moteur dynéine au niveau du corps basal du cil puis vers le noyau cellulaire où il intervient en tant que facteur de transcription (Figure 5). L'étude de modèles animaux KO (knock out) pour les gènes de la voie de signalisation Hh révèlent son implication dans l'ossification endochondrale. Ainsi, les souris KO *Ihh* présentent un retard de croissance et une cage thoracique courte et étroite (Karp et al., 2000; St-Jacques et al., 1999). L'inactivation chez la souris du gène *Ift88*, codant pour une protéine du complexe B du transport intraflagellaire, entraîne des anomalies de la voie de signalisation Shh et Ihh conduisant à une polydactylie et une interruption de l'ossification endochondrale respectivement (Haycraft et al., 2007). En revanche les souris mutants Gli3

présentent non seulement des anomalies du système nerveux central, mais aussi des anomalies au niveau des poumons et une polydactylie (Hui et al., 1994).

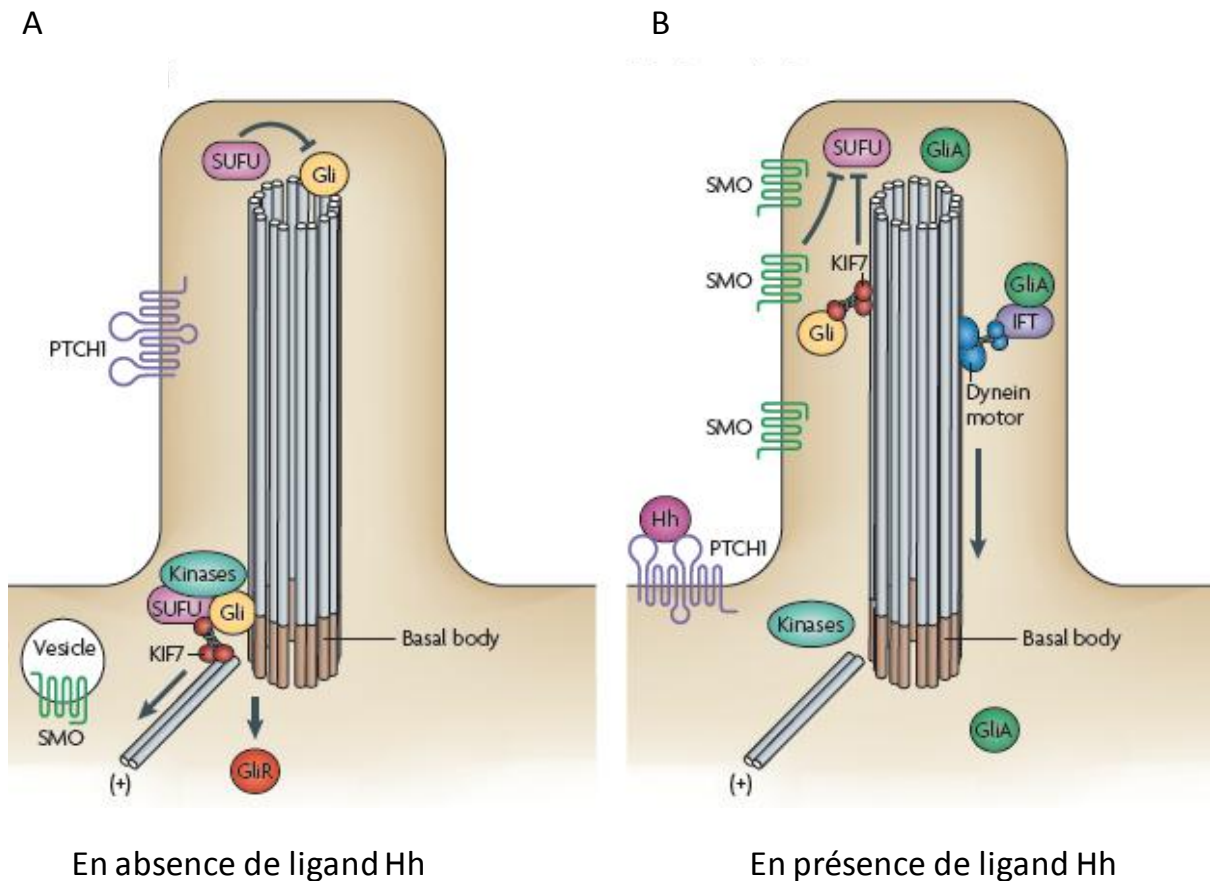


FIGURE 5 : VOIE DE SIGNALISATION HH CHEZ LES MAMMIFERES

A : En l'absence de ligand, le récepteur Patched 1 localisé dans le cil bloque l'entrée de SMO dans le cil. La kinésine KIF7, localisée au niveau du corps basal du cil, forme un complexe avec les protéines Gli. KIF7 empêche la maturation de Gli en GliR. La translocation nucléaire de GliR réprime l'expression des gènes cibles.

B : En présence du ligand Hh, SMO se déplace vers la membrane plasmique du cil et KIF7 entre dans le cil induisant la maturation de Gli en GliA qui s'accumule au niveau apical du cil. GliA est transporté hors du cil par les dynéines, particules du transport intraflagellaire retrograde puis vers le noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles. Modifiée de (Goetz and Anderson, 2010).

B. LES CILIOPATHIES

1. Généralités

Diverses maladies monogéniques telles que le syndrome de Bardet-Biedl (BBS), le syndrome de Joubert (JBTS), le syndrome de Meckel (Hildebrandt et al., 2011), certains sous-type l'amaurose congénitale de Leber et certaines autres Rétinite Pigmentaire, le syndrome Orofaciodigitale (OFD), le syndrome d'Alström (ALS), les Côtes Courtes-Polydactylie (CCP type I-IV), la Dystrophie Thoracique de Jeune (DTJ), le syndrome d'Ellis van Creveld (EVC), la Néphronophtise (NPHP) et la Polykystose Rénale (PKS) sont caractérisées par le dysfonctionnement du cil et font donc partie du groupe des ciliopathies (Badano et al., 2006). Les avancées moléculaires récentes ont permis l'identification d'un grand nombre de gènes à l'origine de ces ciliopathies (Figure 6). Dans le cadre de ma thèse je me suis intéressée aux ciliopathies à présentation squelettique ou groupe des Côtes Courtes - Polydactylie (CCP). Les CCP sont transmises selon un mode autosomique récessif et sont caractérisées par une étroitesse thoracique, un aspect du bassin en trident, une brièveté des os longs et une polydactylie inconstante. Elles se distinguent les unes des autres par la présence de malformations viscérales diverses et par l'aspect de leur métaphyses (Elcioglu and Hall, 2002; Warman et al., 2011). Ce groupe comporte six entités distinctes dont quatre formes létales : le syndrome de Saldino Noonan ou type I (MIM 263530), le syndrome de Majewski ou type II (MIM 263520), le syndrome de Verma-Naumoff ou type III (MIM 263510), le syndrome de Beemer-Langer (MIM 26986) ou type IV et deux formes compatibles avec la vie, la Dystrophie Thoracique de Jeune (MIM 611263, MIM613091, MIM 613819, MIM 614376) et le syndrome d'Ellis Van Creveld (MIM 225500). Il existe un chevauchement clinique et moléculaire entre les CCP et chaque entité semble présenter une grande hétérogénéité génétique. Deux autres entités sont cliniquement proches des CCP, il s'agit du syndrome de Sensenbrenner (MIM 218330, MIM 613610, MIM 614099, MIM 614378) et le syndrome de Saldino-Mainzer (MIM 266920).

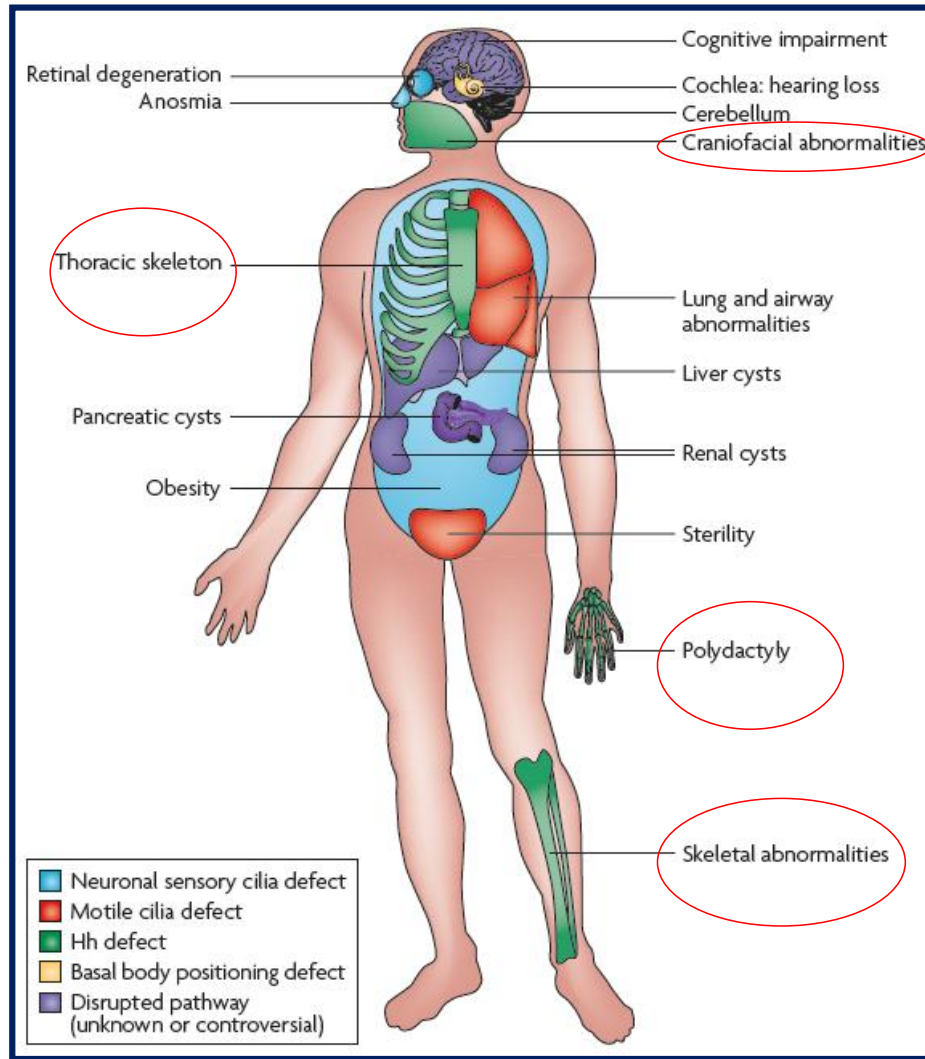


FIGURE 6 : ORGANES ATTEINTS DANS LES CILIOPATHIES HUMAINES

De nombreuses maladies humaines pléiotropiques ont été attribuées à des défauts dans la formation des cils. En rouge les anomalies squelettiques. Modifié de (Goetz and Anderson, 2010).

2. CCP létales

a. CCP de type I ou syndrome de Saldino-Noonan

Le syndrome de Saldino-Noonan ou type I (MIM 263530), décrit en 1972, est caractérisé par des membres courts, des métaphyses en flammèches, des défauts osseux au niveau du crâne, des vertèbres et du pelvis et un bassin en trident (Saldino and Noonan, 1972) (figure 7). Des malformations viscérales gastro-intestinales, génitales et rénales peuvent s'y associer. A ce jour, il n'y a pas de bases moléculaires identifiées.

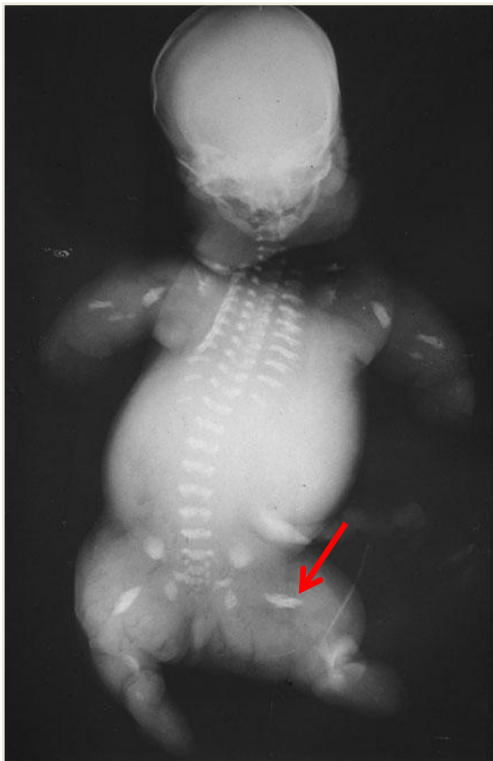


FIGURE 7 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP DE TYPE I

Notez l'étroitesse thoracique, la brièveté des os longs les métaphyses en flammèche (en rouge).

b. CCP de type II ou syndrome de Majewski

Le syndrome de Majewski ou type II (MIM 151050), décrit en 1971 (Majewski et al., 1971), est caractérisée par une agénésie tibiale, une polydactylie pré et postaxiale (figure 8) associée à une hypoplasie unguéale, des malformations viscérales multiples y compris cérébrales (holoprosencéphalie, agénésie du corps calleux, polymicrogyrie), des malformations faciales et orales (fentes labiales, anomalies de la langue), une rétrognathie, un hypertélorisme et d'autres malformations (malrotation intestinale, méésentère commun, kystes rénaux et malformations cardiaques). Sur le plan moléculaire, des mutations dans le gène *NEK1* (Never In Mitosis Gene A-related kinase 1) codant pour une sérine-thréonine kinase ont été identifiées. Dans une famille, une mutation à l'état hétérozygote a été identifiée dans *NEK1* (MIM 604588) et dans *DYNC2H1* (MIM 603297) suggérant un digénisme allélique (Thiel et al., 2011).

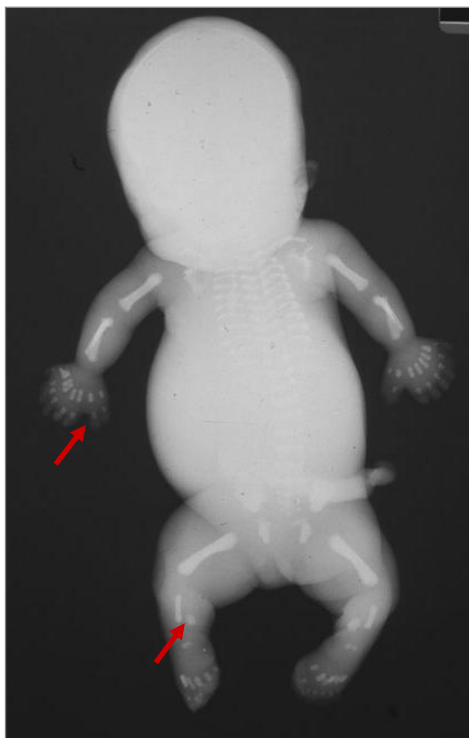


FIGURE 8 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP DE TYPE II Noter l'étroitesse thoracique, la brièveté des os longs, l'agénésie tibiale (flèche rouge), et la polysyndactylie / polydactylie (flèche rouge)

c. CCP de type III ou syndrome de Verma-Naumoff

Le syndrome de Verma-Naumoff ou type III (MIM 263510), décrit en 1977 (Naumoff et al., 1977), ressemble à la DTJ mais avec une symptomatologie plus précoce en anténatal et plus sévère, avec des spicules métaphysaires (Figure 9). Sur le plan viscéral, il est caractérisé par des malformations uro-génitales, gastro-intestinales, cérébrales et cardiaques (Meizner and Barnhard, 1995; Wu et al., 1995). Des mutations dans *IFT80* (MIM 611177) et *DYNC2H1* ont été identifiées dans les CCP de type III et la DTJ suggérant que les CCP de type III et la DTJ sont des variantes d'une seule maladie (Cavalcanti et al., 2011; Dagoneau et al., 2009; Ho et al., 2000; Merrill et al., 2009).



FIGURE 9 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP DE TYPE III

A noter l'étroitesse thoracique sévère, une brièveté des os longs, des spicules métaphysaires (en rouge)

d. CCP de type IV ou syndrome de Beemer-Langer

Le syndrome de Beemer-Langer ou type IV (MIM 290970), décrit en 1983 (Beemer et al., 1983) est proche du type II mais s'en distingue par l'absence de polydactylie et la présence d'un tibia (Hennekam, 1991). Les os longs sont courts avec des métaphyses rondes et un tibia trapu plus long que le péroné. Les os des avant-bras sont incurvés, une polydactylie post-axiale est possible mais très inconstante (Figure 10). Il peut exister aussi une platyspondylie modérée. Les malformations viscérales sont variées avec des atteintes génitales, gastro-intestinales des atteintes cérébrales (Cideciyan et al., 1993). A ce jour, il n'y a pas de base moléculaire identifiée.

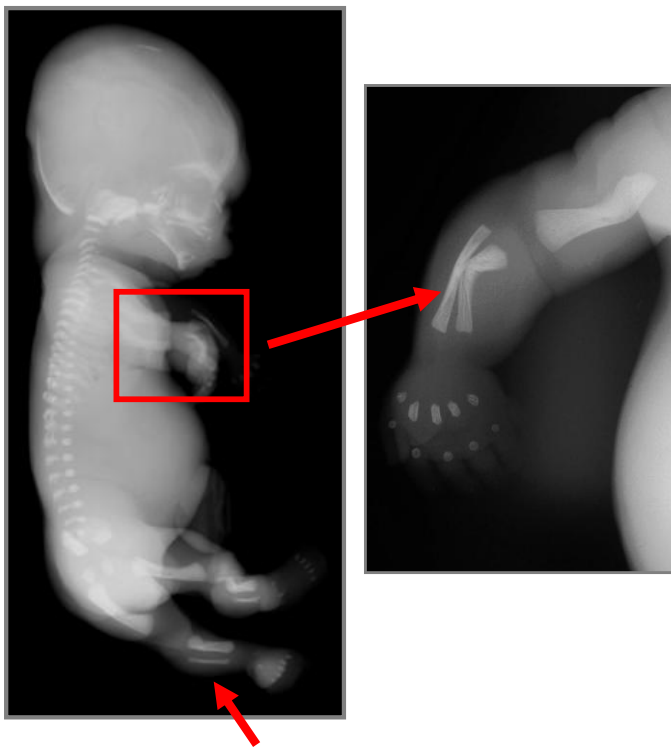


FIGURE 10 : MANIFESTATIONS RADIOLOGIQUES DES CCP TYPE IV

Noter l'étroitesse thoracique, la brièveté des os longs, les métaphyses rondes, le tibia trapu et plus long que le péroné ainsi que l'incurvation des os du cubitus et du radius (en rouge).

e. CCP de type V

Récemment, une forme sévère de CCP, classée comme CCP de type V (MIM 614 091) a été décrite dans deux familles. La première famille présente, chez les deux fœtus atteints, une polysyndactylie, un défaut de latéralité, des reins kystiques, une hypominéralisation des segments acromésoméliques et une campomélie. Les caractéristiques cliniques et radiologiques de la deuxième famille sont : une micromélie extrême, une polydactylie post-axiale et des anomalies faciales (Mill et al., 2011). Des mutations dans *WDR35* (MIM 613602) ont été identifiées chez ces trois fœtus.

3. CCP compatible avec la vie

a. La DTJ

La dystrophie thoracique de Jeune (MIM 208500) a été décrite en 1954 chez un patient présentant une étroitesse thoracique, des membres courts et une polydactylie (Jeune et al., 1955). C'est une maladie rare qui touche un nouveau né sur 100 000. Au cours du développement, des atteintes rénales, hépatiques et ophtalmologiques peuvent apparaître (Bard et al., 1978; Oberklaid et al., 1977) (Figure 11. Sur le plan clinique, les patients présentent une étroitesse thoracique, une micromélie à prédominance rhizomélique et une polydactylie inconstante. La DTJ est génétiquement hétérogène. A ce jour 5 gènes ont été identifiés: *IFT80* (MIM 611177) (Beales et al., 2007), *DYNC2H1* (MIM603297) (Dagoneau et al., 2009; Merrill et al., 2009), *TTC21B* (MIM 612014) (Davis et al., 2011), *WDR19* (MIM 608151), *IFT140* (MIM 614620) (Perrault et al., 2012)

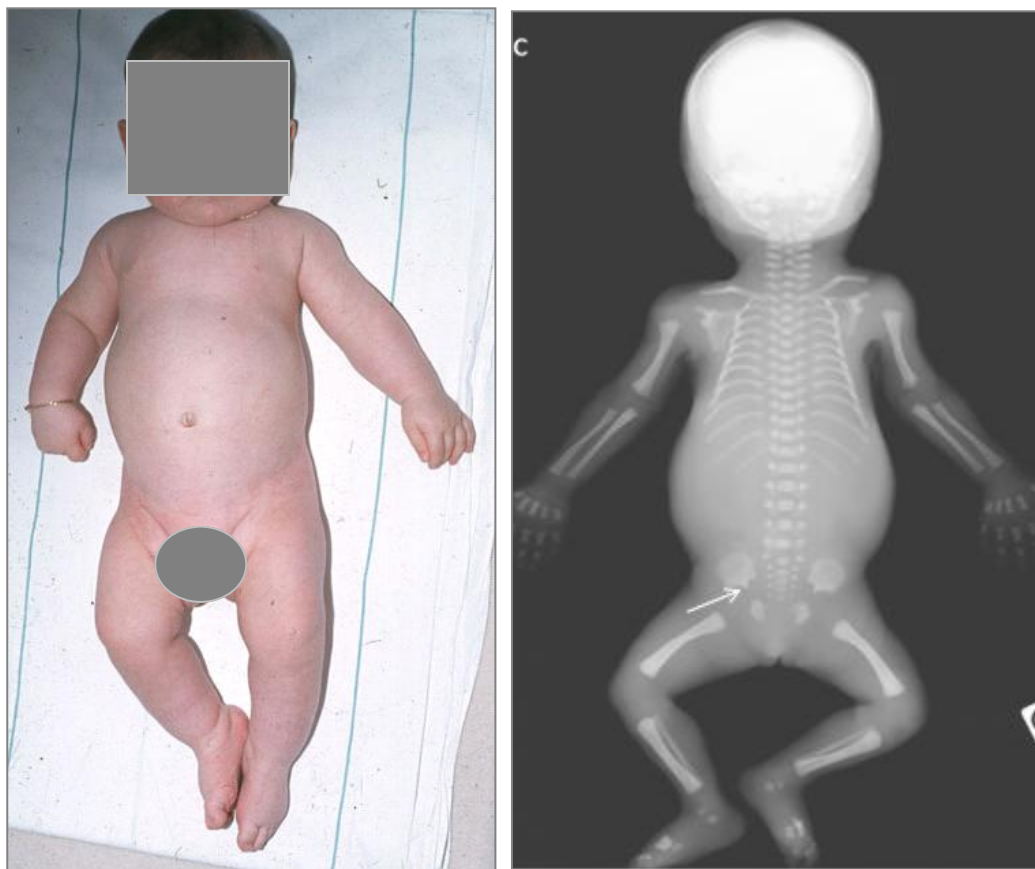


FIGURE 11 : MANIFESTATIONS CLINIQUES RADIOLOGIQUE DE LA DTJ

Noter le bassin en trident (flèche rouge) et l'étroitesse thoracique.

b. L'EVC

Le syndrome d'Ellis Van Creveld (MIM 225500), décrit en 1940, est une dysplasie chondro-ectodermique (Ellis and van Creveld, 1940) et est caractérisée par une micromélie, une étroitesse thoracique souvent modérée, une polydactylie, un aspect du bassin en trident. En outre, il est caractérisé par une dysplasie des dents et des ongles, des freins gingivaux, et par la présence fréquente d'une cardiopathie (Figure 12). Sur le plan moléculaire, deux gènes ont été identifiés *EVC* (MIM 604831) et *EVC2* (MIM607261) (Baujat and Le Merrer, 2007; Galdzicka et al., 2002; Locker et al., 2007; Thompson et al., 2007).



FIGURE 12: MANIFESTATIONS CLINIQUES D'EVC

A noter la dysplasie des dents et la polydactylie post-axiale.

c. Le syndrome de Sensenbrenner

Le syndrome de Sensenbrenner (MIM 218330) ou dysplasie cranioectodermique a été décrit en 1975 (Sensenbrenner et al., 1975). Il est caractérisé par une craniosténose (Levin et al., 1977) et a des caractéristiques similaires à la DTJ et l'EVC : retard statural (membres courts), brachydactylie, étroitesse thoracique, épiphyses en cônes (au niveau des mains), anomalies ectodermiques (dysplasie des dents et des ongles), fibrose hépatique, rétinite pigmentaire, néphronophtise (Amar et al., 1997) (Figure 13). A ce jour, 4 gènes ont été identifiés: *IFT122*, *WDR35*, *IFT43* et *WDR19* (Arts et al., 2011; Ashe et al., 2012; Gilissen et al., 2010; Walczak-Sztulpa et al., 2010).

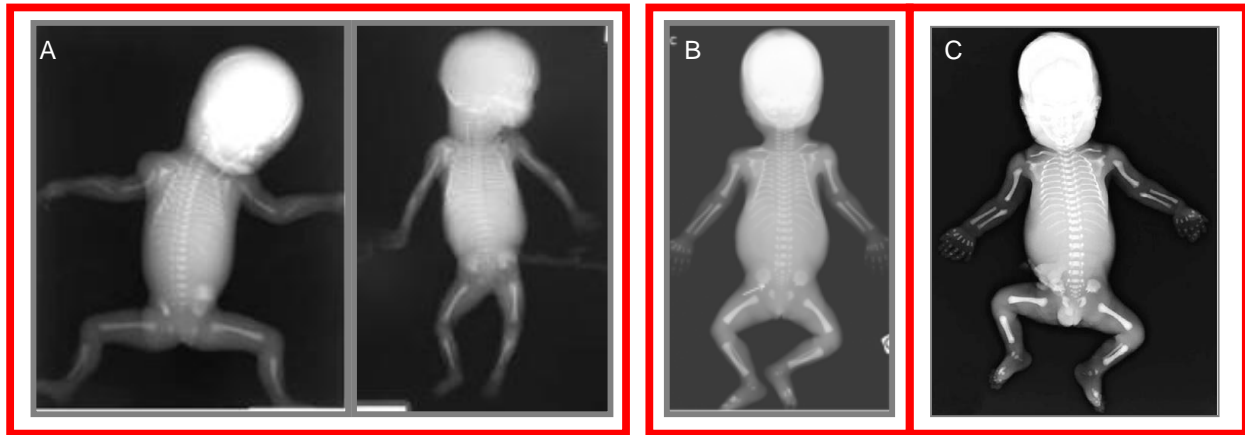


FIGURE 13 : COMPARAISONS RADIOLOGIQUES ENTRE SENSENBRENNER (A), DTJ (B) ET EVC (C) Le syndrome de Sensenbrenner se rapproche de la DTJ et de l'EVC. A noter, la brachydactylie, et l'étroitesse thoracique. Les photos radiologiques du syndrome de Sensenbrenner et de l'EVC sont extraites de (Chen et al., 2010; Konstantinidou et al., 2009)

d. Le syndrome de Saldino-Mainzer

Le syndrome de Saldino-Mainzer (MIM 266920) a été décrit en 1970 (Mainzer et al., 1970). Il est caractérisé par une brachydactylie avec épiphyses en cônes, une dysplasie rénale, une rétinite pigmentaire et une ataxie cérébelleuse. Il existe un chevauchement radiologique avec la DTJ et le syndrome de Sensenbrenner. Sur le plan moléculaire, le gène *IFT140* a été identifié récemment dans 10/17 cas de syndrome de Saldino-Mainzer et un cas de DTJ. (Perrault et al., 2012) (Figure 14).

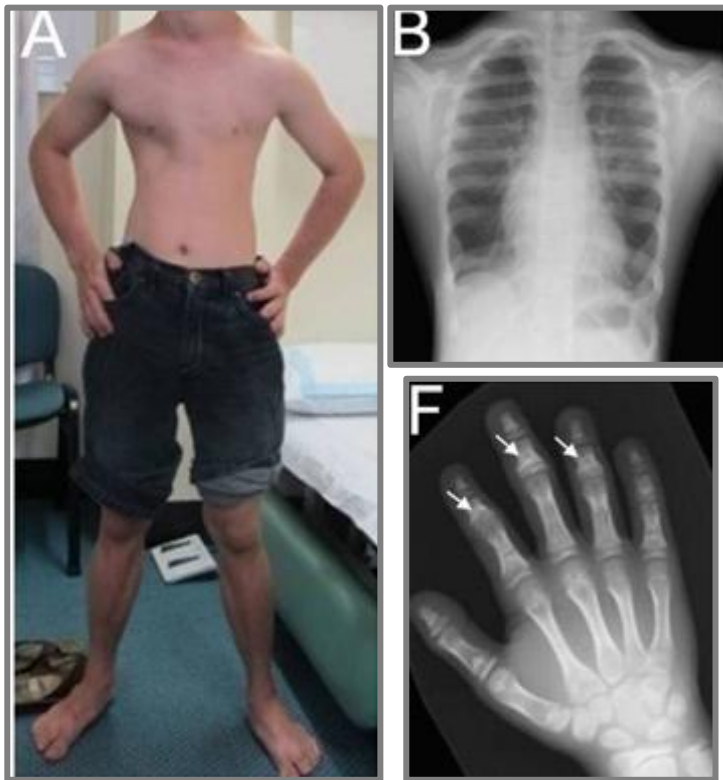


FIGURE 14 : LE SYNDROME DE SALDINO-MAINZER Patient de 17 ans présentant une étroitesse thoracique (A-B) et des épiphyses en cônes (F). (Modifié de Perrault et al., 2012).

Au total à ce jour, des mutations dans le moteur à dynéine (*DYNC2H1*), dans le complexe IFT -B (*IFT80*) IFT-A (*IFT122*, *IFT43*, *WDR35*, *WDR19* (*IFT144*), *TTC21B* (*IFT139*), *IFT140*, ou au niveau des gènes du corps basal (*NEK1*, *EVC*, *EVC2*) on été identifiées dans le cadre des CCP.

4. Fonction des protéines ciliaires identifiées à ce jour dans les CCP

a. Protéines ciliaires du corps basal

Trois protéines identifiées à ce jour dans les CCP sont situées au niveau du corps basal du cil : Evc/Evc2 et Nek1.

Les gènes *EVC/EVC2*, localisés sur le chromosome 4p16.2, codent pour des protéines transmembranaires dont l'interaction favorise leur localisation au niveau du corps basal du cil

(Galdzicka et al., 2002; Ruiz-Perez et al., 2000). De plus, Evc2 serait un régulateur positif de la voie de signalisation Hh (Blair et al., 2011) à la base des cils des chondrocytes (Ruiz-Perez et al., 2007; Ruiz-Perez et al., 2000). Le mutant souris *EVC*^{-/-} développe un phénotype de type EVC, avec une malformation cardiaque mais sans polydactylie. Un décès précoce est fréquent à J+2 et les survivants suivent un régime alimentaire particulier due à des anomalies dentaires (Ruiz-Perez et al., 2007).

Le gène *NEK1*, localisé sur le chromosome 4q33, code pour une sérine/thréonine kinase associée aux centrosomes et transportée pendant la mitose du noyau au corps basal afin d'initier la formation du cil (Hilton et al., 2009; Thiel et al., 2011). *NEK1* contient deux signaux de localisation nucléaire (NLS) fonctionnels et deux signaux d'exportation nucléaire (NES) suggérant qu'il aurait un rôle dans la transduction des messages du corps basal jusqu'au noyau et dans la régulation de l'expression des gènes nucléaires (Hilton et al., 2009). Les mutations faux-sens identifiées dans *NEK1* sont situées au niveau du domaine N-terminale kinase (acides aminés 1-258) entraînant une perturbation au niveau des centrosomes et donc au niveau de la ciliogenèse (White and Quarumby, 2008). Les souris mutantes *kat*^{2J/2J} ont des malformations faciales, un retard statural, une stérilité chez les mâles, une anémie et une polykystose rénale progressive (Janaswami et al., 1997; Upadhyay et al., 2000; Vogler et al., 1999). Dans les cellules de fibroblastes d'embryons de souris *kat*^{2J/2J}, Nek1 est localisé au niveau du corps basal et le nombre de cils primaires est considérablement réduit (Shalom et al., 2008)

b. Protéines ciliaires du moteur à dynéines

DYNC2H1 (Dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1) est localisé sur le chromosome 11q22.3 et code pour une sous-unité du complexe dynéine cytoplasmique impliqué dans le transport intraflagellaire rétrograde du cil (Dagoneau et al., 2009; Merrill et al., 2009). Des mutations hypomorphes dans *DYNC2H1* ont été identifiées dans la DTJ et dans les CCP de type III (Dagoneau et al., 2009; Merrill et al., 2009). Chez les mutants *Dync2h1*^{lln/lln}, une perte de signalisation de Shh a été démontrée dans le tube neural avec une mort précoce autour de E10.5 (Huangfu and Anderson, 2005; May et al., 2005). Les protéines Ift, Smo, Ptch1 et Gli2 sont retenues dans le cil à cause du défaut du transport rétrograde ce qui inhibe l'activation de gènes cibles dans le noyau (Ocbina et al., 2011). Les doubles mutants *Dync2h1*^{lln/lln}/*Ift172*^{avc1/avc1} et *Dync2h1*^{lln/lln}/*Ift122*^{Sopb/Sopb} présentent une perturbation de la voie de signalisation Shh et des

anomalies de structure du cil. L'ensemble de ces résultats montrent que l'équilibre entre le transport antérograde et le transport rétrograde contrôle l'architecture du cil, qui à son tour induit la voie de signalisation Shh (Ocbina et al., 2011).

c. Protéines ciliaires du complexe IFT

i. Complexe IFT-B

Le gène *IFT80* (Transport IntraFlagellaire 80) est localisé sur le chromosome 3q26.1 et code pour une protéine Ift impliquée dans le transport intraflagellaire antérograde (Beales et al., 2007). Des mutations hypomorphes dans *IFT80* ont été identifiées dans la DTJ (Beales et al., 2007) et par la suite chez des patients CCP de type III (Cavalcanti et al., 2011). Ift80 est localisée au niveau du corps basal et dans l'axonème ciliaire. Des études ont montré qu'en appauvrissant les cellules Tift80 (*Tetrahymena thermophilie* orthologue), 70% de ces cellules ont des cils courts, boursoufflés voire même absents. Les embryons de poisson zèbre *ift80^{-/-}*, ont un phénotype plus sévère avec des kystes rénaux, un œdème péricardique (Beales et al., 2007), et une dégénérescence des photorécepteurs (Hudak et al., 2010). Les souris *Ift80^{gt/gt}* hypomorphes ont des caractéristiques cliniques et radiologiques semblables à la DTJ et aux CCP de type III avec une létalité embryonnaire, un retard de croissance, une brièveté des os longs, une étroitesse thoracique et une polydactylie. Chez le poisson zèbre *ift80^{-/-}*, PTC1 est diminué suggérant que les *ift80* agit en aval de PTC1 (Beales et al., 2007).

ii. Complexe IFT-A

Le gène *TTC21B* (domaine de répétition tetratricopeptide 21B) est localisé sur le chromosome 2q24.3 et code pour une protéine du transport intraflagellaire rétrograde : IFT139 (Davis et al., 2011). Il est localisé au niveau du corps basal et de l'axonème. *TTC21B* est impliqué dans un cas de DTJ et cinq cas de Néphronophtise (NPHP, MIM 613 820) (Davis et al., 2011). Les mutations identifiées dans la DTJ sont des pertes partielles de la fonction du gène. Les souris mutants *Ttc21b^{aln/aln}* ont des défauts au niveau des membres, des yeux et du cerveau (Stottmann et al., 2009; Tran et al., 2008). Le cil est boursoufflé et contient des protéines Ift telles que Ift88 qui sont séquestrées ce qui induit un défaut partiel au niveau du transport rétrograde et une accumulation de protéines du complexe B (Tran et al., 2008) En outre, cela induit une

suractivation de la voie Shh résultant d'une augmentation de l'expression PTCH1 qui conduit finalement à une suractivation de Gli2 et Gli3 (Stottmann et al., 2009; Tran et al., 2008).

Le gène *WDR19* (WD Repeat domain 19) est localisé sur le chromosome 4p14 et code pour la protéine IFT144 du complexe A. Récemment, des mutations faux-sens dans un cas atteint de DTJ et des mutations faux-sens/ non-sens dans un cas atteint du syndrome de Sensenbrenner ont été identifiées. *WDR19* est localisé tout au long du cil avec des signaux au niveau de sa base et de son sommet dans les fibroblastes sauvages (Bredrup et al., 2011). Des études ont été faites dans des fibroblastes de patients mutés et atteints du syndrome de Sensenbrenner et aucune perte de fonction n'a été identifiée mais les cils sont réduits en tailles et en nombres. En revanche, dans les fibroblastes de patients atteints de la DTJ, aucune différence significative n'est notée au niveau du cil. Des anomalies au niveau du complexe IFT-A induisent une accumulation des protéines du complexe B au niveau apical du cil (Absalon et al., 2008; Arts et al., 2011; Iomini et al., 2009). Le phénotype ciliaire observé chez les DTJ est moins sévère comparé aux fibroblastes du syndrome de Sensenbrenner.

Le gène *IFT122* est localisé sur le chromosome 3q21.3-q22.1 et code pour une protéine composée de 7 domaines WD40. Des mutations faux-sens ont été identifiées dans trois cas de syndrome de Sensenbrenner (Walczak-Sztulpa et al., 2010). Dans les fibroblastes de patients avec des mutations homozygotes faux-sens, les cils sont réduits en nombres et en taille. Les embryons *ift122*^{-/-} de poisson-zèbre présentent des kystes rénaux. Le nombre de cils est réduit de façon spectaculaire induisant une insuffisance rénale (Walczak-Sztulpa et al., 2010). Une autre étude montre que les souris *Ift122*^{sopb/sopb} meurent à E13.5 avec défaut neuronal, une polydactylie pré-axiale et des défauts oculaires. Les cils nodaux sont courts et gonflés. Il y a une accumulation d'Ift88 et d'Ift57 au niveau du sommet apical. IFT144 et IFT140 forment le noyau du complexe IFT-A. Dans les fibroblastes d'embryons de souris mutantes, Ift140 est indétectable alors qu'Ift122 est nécessaire à la stabilité du complexe A. En outre, les doubles mutants *Gli2*^{sopb} montrent qu'Ift122 régule négativement la voie Shh (Qin et al., 2011).

Le gène *WDR35* (domaine de répétition WR 35) est localisé sur le chromosome 2p24.1 et code pour la protéine IFT121. Des mutations dans *WDR35* ont été identifiées dans deux familles porteuse du syndrome de Sensenbrenner et dans deux familles avec un phénotype de CCP atypique ou non classé (Gilissen et al., 2010). *WDR35* contient sept domaines proches de *WDR40*. Les embryons de souris mutants meurent avant 12.5 jours (Mill et al., 2011). Ils présentent des malformations cardio-vasculaires et rénales, une hypoplasie des poumons et une polysyndactylie. Chez les mutants yetis, *Wdr35* est localisé au niveau du centrosome. Les fibroblastes des patients mutés dans *WDR35* et les souris yeti, présentent des cils courts et *ift88* est accumulée autour du corps basal (Mill et al., 2011).

Le gène *IFT43* (transport intraflagellaire 43), localisé sur le chromosome 14q24.3, est responsable d'un cas de syndrome de Sensenbrenner (délétion homozygote au niveau N-terminal) (Arts et al., 2011). Les fibroblastes de patients présentent des cils courts similaires aux cils de fibroblastes de patients mutés *IFT122* (Walczak-Sztulpa et al., 2010). En outre, il y a une accumulation de IFT88 et IFT57 dans la partie distale et au sommet apical des cils (Arts et al., 2011).

Le gène *IFT140* (transport intraflagellaire 140) est localisé sur le chromosome 16p13.3. Des mutations faux-sens, non-sens ou mutations introniques ont été identifiés par exome et séquençage de type Sanger dans 10 familles atteintes du syndrome de Saldino-Mainzer et une famille porteuse de la DTJ. L'analyse des fibroblastes de deux patients montrent qu'IFT140, IFT46 et IFT88 sont localisées tout au long du cil alors que ses protéines sont situées au niveau du corps basal et apical dans les fibroblastes témoins (Perrault et al., 2012).

II. OBJECTIFS DE MA THESE

Notre équipe « Bases Moléculaires et Physiopathologiques des Chondrodysplasies » de l'unité U781, s'intéresse aux bases moléculaires des CCP depuis une dizaine d'années en association avec le Centre de Référence national pour les Maladies Osseuses Constitutionnelles (CR MOC). C'est ainsi qu'en 2009, des mutations dans *DYNC2H1* ont été identifiées dans notre équipe dans la DTJ et les CCP type III (Dagoneau et al., 2009) Grâce au CR MOC, aux collaborations nationales et internationales et grâce à l'obtention d'un financement par le Projet Hospitalier de Recherche clinique (PHRC AOM 06031), nous avons recueilli les prélèvements de 15 EVC, 94 DTJ, 11 CCP III, 13 CCP II et 7 CCP IV. De plus dans le cadre du PHRC national, une étude clinique approfondie combinée à une étude moléculaire a été réalisée chez 53 patients (39 familles) DTJ.

Mon projet de thèse se divise en 3 volets :

1. Contribution à l'identification des bases moléculaires de la DTJ par séquençage direct de *DYNC2H1* et/ou *IFT80* dans le cadre du PHRC national et établissement de corrélations génotype/phénotype.
2. Contribution à l'identification de nouveaux gènes dans la DTJ en analysant deux familles consanguines, chez qui *DYNC2H1* et *IFT80* ont été exclus. Les stratégies utilisées combinent la Cartographie par Homozygotie et le séquençage haut débit.
3. Contribution à l'identification des bases moléculaires des CCP types II et IV par l'analyse de *NEK1* et *DYNC2H1*.

III. MATERIELS ET METHODES

1. Données cliniques des patients DTJ du PHRC national

L'étude a été menée dans le cadre d'un Programme hospitalier de recherche clinique (PHRC, AOM 06031), financée par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, approuvée par le Comité Éthique et enregistrée auprès de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et au Système d'Enregistrement de Protocole International (ClinicalTrials.gov, NCT00948376). Entre 2007 et 2009, les données cliniques et prélèvements de 53 cas de DTJ issus de 39 familles et incluant 30 fœtus et 23 cas vivants ont été recueillis. Parmi ces 39 familles, six étaient consanguines. 31 familles étaient originaires de France, deux du Portugal, deux de Turquie, une d'Allemagne, une d'Algérie, une du Maroc et une de Pologne.

Parmi les 30 fœtus (issus de 18 familles différentes), 50% étaient de sexe masculin et 50% de sexe féminin, issus de grossesses interrompues (IMG) entre la 14^{ème} et la 35^{ème} semaine d'aménorrhée (SA). Neuf familles ont subi deux ou trois IMG. Tous les fœtus répondaient aux critères diagnostiques de la DTJ : (1) étroitesse thoracique (2) brièveté des os longs (3) aspect en trident du bassin (4) rapport détaillé foeto-pathologique (5) disponibilité des échantillons d'ADN des cas index et des parents (6) consentement signé par les parents.

Les 23 patients vivants, issus de 23 familles différentes, comprenaient 8 filles et 15 garçons âgés de six mois à 48 ans (âge moyen de 10,6 ans). Parmi eux, deux familles avaient également subi deux IMG. Tous les patients répondaient aux critères diagnostiques de la DTJ : 1) côtes courtes et étroitesse thoracique 2) aspect en trident du bassin 3) os longs "courts" 4) disponibilité des échantillons d'ADN des patients et des parents. Nous avons exclu les patients portant des caractéristiques cliniques d'Ellis Van Creveld (EVC) ou de syndromes oro-facio-digitaux (OFD). Un suivi clinique a été réalisé pour les 23 patients. L'étude phénotypique consistait en : 1) examen physique avec mesures 2) radiographies 3) bilan biologiques hépatique, rénal, pancréatique 4) échographies abdominales et cardiaques. Une évaluation fonctionnelle pulmonaire (spirométrie) et un électrorétinogramme ont été réalisés uniquement chez les enfants âgés de plus de 5 ans.

2. Données cliniques des familles atteintes de la DTJ, non liées à DYNC2H1 ou IFT80: famille N et famille A

a. Famille N

La famille N est d'origine yéménite (Figure 15), les parents sont cousins issus de germains ($f = 1/16$). Elle est constituée de six enfants sains (V.2-V.7) et de trois enfants atteints (V.1, V.8 et V.9). Il existe une variabilité phénotypique entre les trois enfants atteints. Le patient V.1 de sexe masculin est modérément atteint alors que V.9 qui est de sexe féminin est mort quelques jours après sa naissance. Enfin V.8 qui est de sexe féminin est vivante mais sévèrement atteinte. Elle a subi une longue période de ventilation et une trachéostomie. Nous n'avons pas plus de renseignements cliniques.

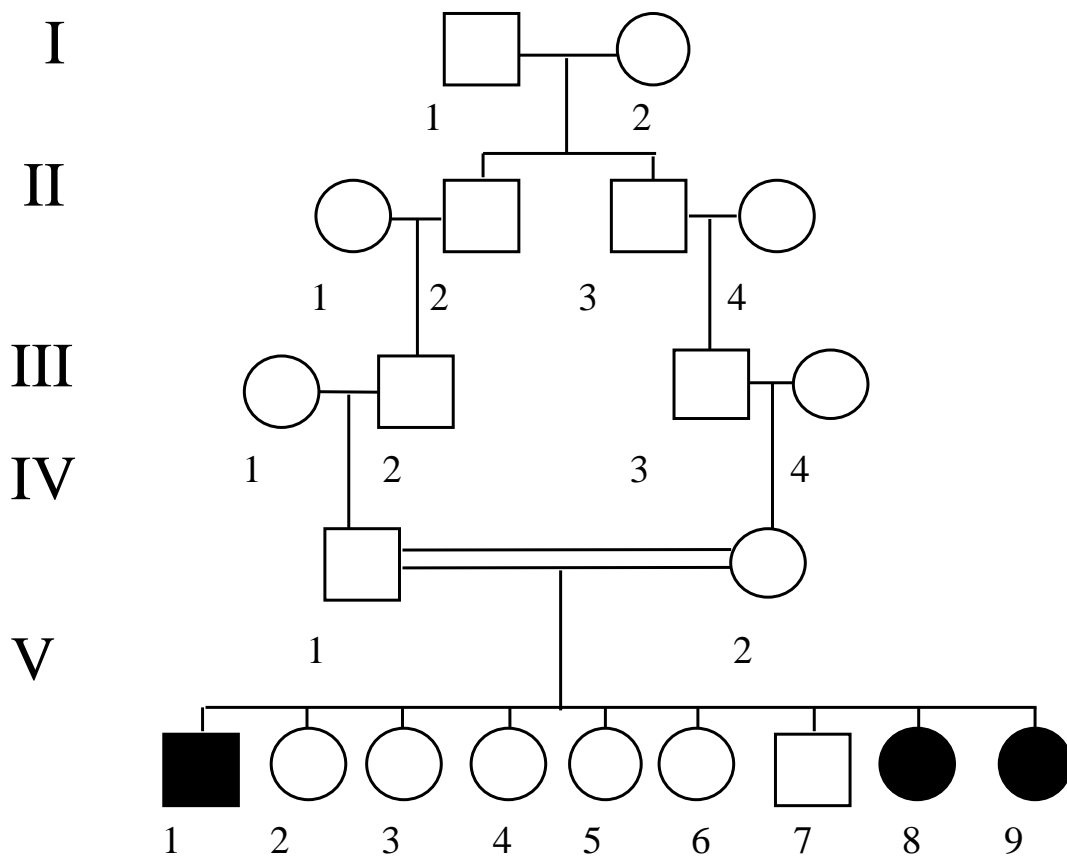


FIGURE 15 : ARBRE GENEALOGIQUE DE LA FAMILLE N D'ORIGINE YEMENITE

b. Famille A

La famille A est une famille consanguine ($f = 1/16$, parents cousins issus de germains) d'origine turque. Ils ont trois enfants sains (V.3-V.4, V-6) et trois enfants atteints de la DTJ (V.1-V.2, V.5) (Figure 16). Il existe une variabilité phénotypique entre les trois enfants atteints (Table 1).

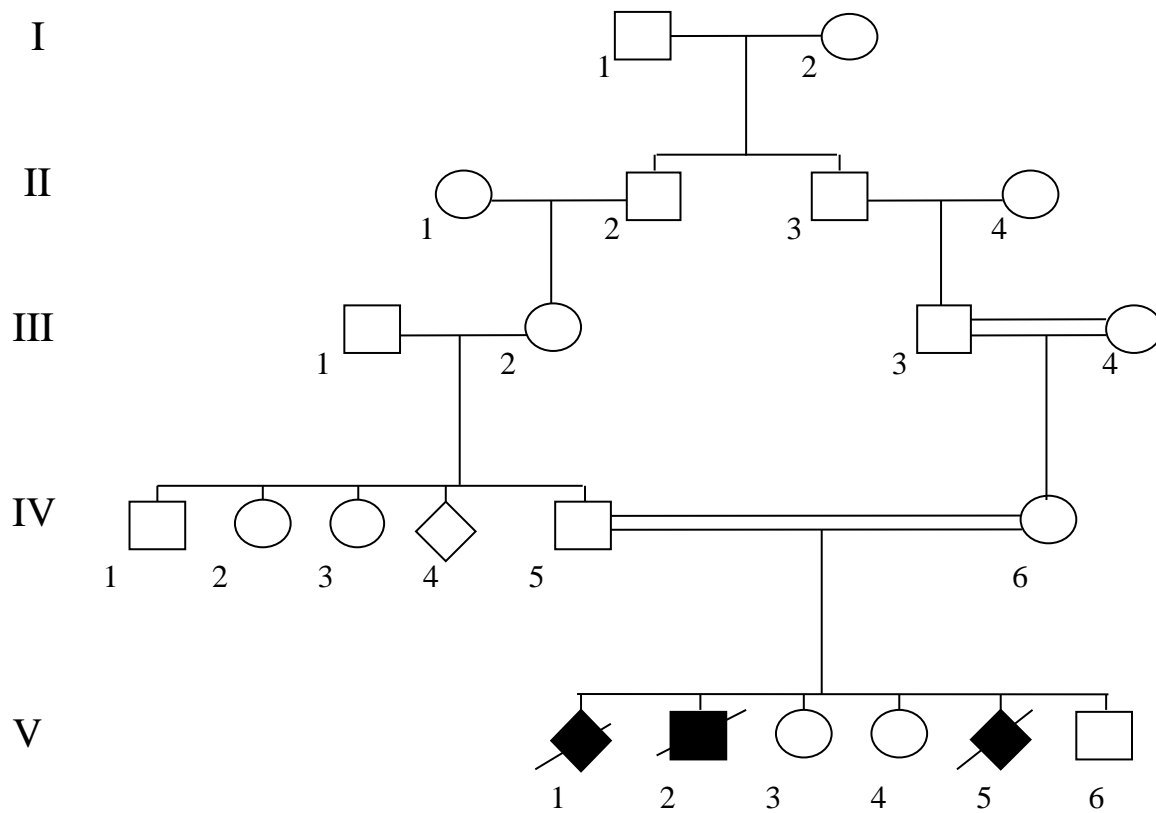


FIGURE 16 : ARBRE GENEALOGIQUE DE LA FAMILLE A D'ORIGINE TURQUE

Cas	Age	Sexe	Fente labiale/palatine	Polydactylie des pieds	Anomalies du bassin	Atteintes rénales	Atteintes cérébrales	Autres
1	27 SA	F	+	-	ailes iliaques courtes, aspect du bassin en trident	Reins fer à cheval	agénésie du corps calleux, polymicrogyrie	hypertélorisme; dysplasie des oreilles; pouces larges et gros orteils; situs inversus; malformation de la 8ème vertèbre dorsale
2	45 jours	M	-	postaxiale du pied droit	aspect du bassin en trident	-	-	Né à terme mais détresse respiratoire; métaphyses évasées avec des éperons
3	15 SA	F	-	-	aspect du bassin en trident	kystes rénaux; anomalie biliaire; polysplénie	-	situs inversus; hétérotaxie; hygroma cervical

TABLE 1 : MANIFESTATIONS CLINIQUES ET RADIOLOGIQUES DES ENFANTS ATTEINTS DE LA FAMILLE A

3. Données cliniques des familles atteintes de CCP de type II (Majewski) et de type IV (Beemer-Langer)

Treize familles CCP de type II et sept familles CCP de type IV ont été incluses dans l'étude soit par le Centre de Référence français des Maladies Osseuses constitutionnelles soit par des généticiens de différents pays (Australie, Belgique, Brésil, Royaume-Uni). Les cas sont issus soit de grossesses interrompues (15-28 SA) soit sont morts à la naissance (32-35 SA). Parmi les CCP type II, cinq cas sont issus de familles consanguines originaires du Liban, d'Inde (avec une récurrence dans la fratrie), du Pakistan et de France. Les huit cas restants sont originaires de Madagascar, de France, du Brésil (avec une récurrence dans la fratrie), du Viêt-Nam, d'Haïti et de Belgique. Ils répondent tous aux critères diagnostiques du CCP de type II soit : (1) étroitesse thoracique (2) brièveté des os longs (3) tibia ovoïde plus court que le péroné ou agénésie du tibia (4) polydactylie pré et/ou postaxiale et/ou une polysyndactylie (5) fente labiopalatine (6) consentement des parents.

Parmi les cas CCP type IV, deux familles sont consanguines et originaires de Tunisie et de Turquie et cinq familles sont non consanguines et originaires de France, d'Algérie, d'Italie et du Royaume-Uni. Ils répondent tous aux critères diagnostiques du CCP de type IV : (1) étroitesse thoracique (2) brièveté des os longs (3) tibia trapu plus long que le péroné (4) métaphyses avec des extrémités rondes (5) incurvation du cubitus et du radius (6) consentement des parents.

4. Extraction d'ADN à partir de sang

Les ADN génomiques des différentes familles ont été collectés grâce à de nombreuses collaborations internationales. Ces ADN ont été obtenus à partir de prélèvements sanguins (5-10 ml) recueillis sur EDTA. L'extraction est réalisée après une hémolyse des hématies par une solution hypo-osmotique composée de : 35g de NH_4Cl + 0,35g de NH_4HCO_3 pour un volume final de 5L. Après centrifugation, le culot de leucocytes est récupéré. L'extraction de l'ADN à partir du culot de leucocytes se fait en utilisant le protocole du kit QIAmp Blood Maxi. Les membranes et le contenu cellulaire des leucocytes sont digérés par 500 μl de protéinase K Qiagen + 6 mL de lysis buffer. L'ensemble est chauffé au bain-marie pendant 10 min à 70°C pour activer la dégradation protéique ainsi que les débris cellulaires par la protéinase K. L'ADN est précipité dans 6 ml d'éthanol (96-100%). Une méduse d'ADN se forme après plusieurs retournements. Le volume est transféré sur une colonne QIAmp Maxi Column pour une centrifugation de 3 min à 3000 rpm. Un premier lavage est effectué par 5 mL de Buffer AW1 suivi d'une centrifugation de 1 min à 3000 rpm. Un second lavage est effectué par 5mL de Buffer AW2 suivi d'une centrifugation de 15 min à 4000 rpm. Ces lavages permettent l'élimination des sels ainsi que les produits digérés. Le filtre contenant l'ADN est ensuite transféré dans une nouvelle colonne. 600 μl de buffer AE sont ajoutés au centre de la colonne puis incubation de 5 min est réalisée pour décrocher l'ADN du filtre. L'élution est complète après une centrifugation de 2 min à 4000 rpm.

5. Extraction d'ADN à partir de tissu

A l'aide d'une aiguille stérile, le fragment de tissu est mis sur la boîte de Pétri puis un morceau de 2-3 mm est découpé à l'aide du bistouri. Il faut ajouter 200 à 500 μ l (taille du tissu) de tampon de Lyse-Urée qui est un dénaturant lipidique et protéique associé au détergeant SDS (20%) à 2% du volume final de tampon de Lyse. Il faut enfin rajouter la protéinase K (10 mg/ml) au 1/100^{ème} de volume de tampon de Lyse (100 μ g/ml final). Le mélange est ensuite vortexé et incubé toute la nuit dans le bain-marie à 37°C pour permettre la lyse des membranes cellulaires. Le lendemain, un traitement à la RNase (10mg/ml) pendant 2h à 37°C est réalisé. 500 μ l (volume à volume avec le tampon de Lyse) de phénol saturé sont ajoutés pour isoler et purifier l'ADN. Il faut ensuite vortexer puis centrifuger 13000 tr pendant 5min. L'ADN se trouve dans la phase supérieure que l'on prélève et que l'on place dans un nouveau tube. La même étape est faite avec le chloroforme-isoamylique (24 :1) pour éliminer les traces de phénol (volume à volume). La phase supérieure est récupérée et 2,5 fois le volume d'éthanol pur (100 %) sont ajoutés afin de précipiter l'ADN. Une fois que la méduse d'ADN est formée, 400 μ l d'éthanol à 70% sont ajoutés pour éliminer les sels en solution. Afin d'éliminer toute trace d'éthanol, l'ADN est séché au speedvac, puis il est resuspendue dans du tampon Tris-EDTA (10 : 1).

6. Dosage des ADN

Les ADN extraits sont ensuite dosés par un spectrophotomètre NanoDrop. Une goutte de 1.5 μ l d'échantillon est déposée sur la surface intérieure de mesure. Une fois que le bras est abaissé, un système d'aimant est activé. Le bras compresse la goutte formant une colonne de liquide permettant la mesure du spectre basée sur un trajet optique de 1 mm. Les acides nucléiques ont une longueur d'onde de 260 nm. La concentration d'ADN est donnée en ng/ μ L. La pureté de l'échantillon est déterminée par un rapport 260/280 (ADN/protéines) supérieur à 1.8 et un rapport 260/230 (ADN/composés organiques) supérieur à 1.5. Pour l'utilisation, les ADN sont dilués à 50 ng/ μ L.

7. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La technique de PCR a été mise au point par *Mullis et al.* En 1986. Elle permet l'amplification *in vitro* de séquences d'ADN. Les ADN polymérases répliquent un brin d'ADN à partir d'une amorce oligonucléotidique sur laquelle elles se fixent. Cette propriété est mise à profit dans la technique de la PCR afin d'amplifier par réplifications successives une séquence déterminée. Deux oligonucléotides ou amorces sont synthétisés. Les amorces sont choisies afin de s'hybrider aux bornes de la séquence cible à amplifier. Tout d'abord, l'ADN est dénaturé à 94°C. L'amorce sens, complémentaire de l'ADN, est choisie sur le brin 5' → 3' de la séquence cible et l'amorce reverse, complémentaire de l'ADN, est choisie sur son brin 3' → 5'. Ces deux amorces s'hybrident aux bornes de la séquence à amplifier à la température d'annealing T_m spécifique à chaque couple d'amorces selon sa richesse en GC. La température est ensuite augmentée à 72°C pour permettre l'élongation des amorces par l'ADN polymérase. Les cycles de PCR sont ainsi répétés pour obtenir un nombre suffisant de copies du fragment d'ADN. A l'issue d'un cycle de réplifications, le nombre de copies d'ADN double. Après 35 cycles, il est multiplié par 2^{35} .

Le T_m est spécifique pour chaque couple d'amorces, il est calculé ainsi :

$$T_m = [(T_h^{\circ}\text{C de l'amorce 5'} = 2 \text{ AT} + 4 \text{ GC}) + (T_h^{\circ}\text{C de l'amorce 3'} = 2 \text{ AT} + 4 \text{ GC})] / 2 - 3^{\circ}\text{C}$$

La température de chaque amorce correspond à sa température d'hybridation sur l'ADN, qui dépend de sa composition en nucléotides. Chaque couple d'amorces, spécifiques de la séquence d'ADN à amplifier, a été choisi à l'aide des banques de données informatiques (Ensembl, UCSC) et du logiciel Primer 3.

Protocole :

50 ng d'ADN sont amplifiés en présence de 0,2 unité de Taq ADN polymérase dans 2.5µl d'un tampon composé de 20 mM de Tris-HCl à pH8, 50mM de KCl, de 1,5 mM de MgCl₂, auquel 0,2 mM de chaque désoxynucléotide (dNTP) et 1µL de chaque amorce à 10µM sont ajoutés. Un témoin négatif est réalisé à chaque PCR pour s'assurer de l'absence de contamination des différents réactifs par de l'ADN. L'ensemble est placé

dans un thermocycleur Applied System Thermal Cyclers 9600 ou 2700. La PCR se déroule alors en 3 étapes :

- une dénaturation de 5 min à 94°C
- une amplification de 30 à 35 cycles constituée pour chaque cycle d'une dénaturation de 30 sec. à 94°C, d'une hybridation de 30 secondes. au T_m des amorces (55°-62°C) et d'une élongation de 30 sec. à 72°C
- une élongation finale de 7 min à 72°C.

Le produit de PCR obtenu est ensuite détecté sur gel d'agarose à 2%, sous UV, par émission de fluorescence due à la présence d'un agent intercalant dans le gel (GelRedTM) afin de s'assurer de sa qualité et de spécificité. Pour cela un marqueur de taille migre en parallèle (Roche Diagnostic Marker).

8. Séquençage direct automatisé

La méthode de séquençage utilisée est celle décrite par *Sanger* en 1981. Le produit d'amplification de la PCR est d'abord purifié. Les dNTP et les amorces non utilisés sont dégradés par digestion enzymatique.

Protocole

- ✓ 1.5µL d'EXOSAP IT (Amersham réf. : US78201) est ajouté à 4 µL de produit de PCR
- ✓ L'ensemble est placé dans un thermocycleur. L'enzyme est activée par chauffage à 37°C pendant 15 minutes puis dégradée à 80°C pendant 15 minutes.

La réaction de séquence est réalisée sur le produit de PCR purifié. Une polymérase réplique le fragment de PCR en présence d'une des deux amorces et incorpore les dNTP ou des ddNTP marqués par des fluorochromes. Chaque ddNTP est associé à un fluorochrome de couleur différent. Une fois incorporé, le ddNTP empêche la poursuite de réplifications de l'ADN. A la fin de la réaction de séquence, des fragments de tailles différentes ont été générés. Ils sont alors séparés sur un gel d'électrophorèse dénaturant et analysés en cours de migration. Un traitement informatique des données permet ensuite d'obtenir la séquence du fragment d'ADN analysé sous

forme d'un chromatogramme.

Protocole :

- ✓ 4.5µL de produit de PCR purifié sont ajoutés à 2 µL d'amorce sens ou anti-sens à 2 µM, 1 µL de BigDye (kit de séquençage ABI PRISM Big Dye Terminator V1.1 réf. : 4337450) et 1.5µL de tampon. Le Big Dye contient la taq polymérase, les dNTP et les ddNTP marqués chacun par un fluorochrome différent.
- ✓ La réaction de séquence s'effectue dans un thermocycleur Thermal Applied Biosystem Cyclor et se déroule en 2 étapes :
 - Une dénaturation de 5 min à 94°C
 - Une série de 30 cycles de réplifications est constituée d'une dénaturation de 15 secondes à 94°C, d'une hybridation de l'amorce sens ou anti-sens à la T_m suivie de son élongation pendant 4 minutes à 60°C.
- ✓ La réaction de séquence est ensuite purifiée sur des colonnes de Séphadex et déposée dans un séquenceur automatique ABI PRISM 3130. Les réactions de séquence passent par de fins capillaires remplis de polymère POP7 sous l'action d'un courant électrique. Les fragments sont séparés en fonction de leurs tailles, les plus petits migrant plus rapidement. Quand les fragments passent devant la cellule de détection, un faisceau laser excite leur fluorescence. Celle-ci est capturée par une caméra couplée à un chargeur qui la convertit en données électriques transférées à l'ordinateur dans le logiciel 3130 Data Collection Software.
- ✓ Les résultats sont visualisés sous la forme d'un chromatogramme grâce au logiciel DNA Sequencing Analysis Software.

9. Cartographie par homozygotie et analyse de liaisons génétiques

Des études de liaison génome entier ont été réalisées sur puces Affymetrix® 250K-Nsp, (génotypage de 262 000 SNPs). Les ADN ont été traités et les puces hybridées sur plateforme Affymetrix® par la plateforme génomique de la Fondation Imagine en suivant les recommandations du fabricant. Les génotypes ont été calculés par le logiciel Genotyping Console qui utilise l'algorithme BRLMM (Affymetrix). L'analyse des génotypes a été réalisée par calcul des lodscores multipoints avec le logiciel MERLIN en supposant un modèle récessif à pénétrance complète (plateforme bioinformatique de l'Université Paris-Descartes).

L'analyse de liaison a pour objectif de localiser sur le génome le gène morbide impliqué dans une région chromosomique grâce à l'étude de marqueurs polymorphes dont on étudie la ségrégation dans des familles. On considère qu'il y a une liaison génétique si tous les patients atteints d'une même famille partagent un haplotype commun. L'analyse de liaison génétique se base sur la méthode des lod-scores : lorsqu'il y a coségrégation entre un marqueur chromosomique et le gène recherché, on dit qu'il y a liaison génétique. Cette liaison est mesurée par des calculs statistiques nommés : lod-scores. Cette notion de « lodscore » vise à quantifier la probabilité que les résultats obtenus pour un marqueur et un gène donnés résultent d'une situation de liaison plutôt que du hasard. En effet, elle permet de tester l'hypothèse de liaison génétique entre deux loci en partant de la ségrégation de deux loci dans un ou plusieurs pedigrees. Ce rapport de probabilité est exprimé en logarithme décimale par le Lod Score $Z(\theta)$ où θ est le taux de recombinaison en cM. On considère que deux loci sont liés génétiquement si $Z = 3$. Si $Z < -2$ alors la liaison est exclue. Si $-2 < Z < 3$ alors on ne peut pas conclure. Il faut alors augmenter le nombre de méioses analysées. Par exemple, on peut augmenter le nombre de familles étudiées car les lod-scores sont additifs. Le lod-score final est la somme des lod-scores obtenus pour chaque famille (Terwilliger and Ott, 1993; Terwilliger, 1994; Tienari et al., 1994).

Ensuite on adapte la stratégie de cartographie par homozygotie pour localiser un trait récessif dans une famille consanguine. En effet, elle consiste à étudier les marqueurs polymorphes chez tous les individus atteints issus d'une famille consanguine et à rechercher les régions homozygotes dans le génome (Lander and Botstein, 1987).

10. Génotypage par étude des marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont des marqueurs génétiques polymorphiques spécifiques à un individu pour un locus chromosomique donné. Ils sont définis par des répétitions de di, tri ou tétranucléotides. La grande variabilité du nombre de répétitions au sein d'une population pour un microsatellite donné en fait un marqueur informatif pour analyser l'héritabilité mendélienne d'un locus au sein d'une famille. Ils sont uniformément répartis sur le génome humain. Les plus fréquents, de type (CA)_n, sont présents tous les 30 à 60 kb ce qui représente potentiellement entre 50000 et 100000 marqueurs. La pertinence de l'information délivrée par des marqueurs dépend du degré d'hétérozygotie dans la population.

Le polymorphisme des microsatellites peut être exploré par PCR. Les amorces sont choisies pour amplifier une séquence unique encadrant le motif répété. Les séquences sont disponibles dans les bases de données informatiques accessibles par internet. L'analyse des microsatellites et de leur ségrégation est possible grâce à une méthode fluorimétrique rapide utilisant des marqueurs fluorochromes. L'amorce sens est couplée à un fluorophore permettant au produit de PCR d'être détecté par le laser du séquenceur ABI PRISM 3130.

Trois fluorophores sont utilisés et chacun a une fluorescence déterminée à une longueur d'onde différente :

~ 6-FAM (bleu) $\lambda = 530\text{nm}$

~ HEX (vert) $\lambda = 540\text{nm}$

~ NED (jaune) $\lambda = 560\text{nm}$

Protocole :

- ✓ 1 μL de produit de PCR est déposé dans un mélange de 13,25 μL de Formamide et 0,75 μL de standard de taille interne marqué par le fluorochrome ROX (400 HD-ROX Perkin Elmer réf. : 402985). Ce standard de taille permet d'établir une courbe de calibration à l'intérieur de chaque piste et de déterminer la taille du marqueur microsatellite.
- ✓ Les produits de PCR migrent le long des capillaires du séquenceur ABI PRISM 3130. La fluorescence est détectée par la caméra après excitation par le faisceau laser. Les données sont transférées vers le logiciel 3130 Data Collection Software.
- ✓ Les résultats sont analysés par le logiciel Genescan 3.1 et visualisés sous forme de chromatogramme grâce au logiciel Genotyper 2.1.

11. Nouvelles stratégies diagnostiques utilisant le séquençage à haut :

a. Design des sondes de capture pour exome ciliaire et exome

Une stratégie de séquençage à haut débit d'exons (SoliD5500xl, Plateforme Génomique, Fondation Imagine) a été mise en place au sein de l'unité 983 par Sophie Saunier. A partir de 3 μg d'ADN de bonne qualité cette librairie de capture d'exons ciliaires (kit à façon SureSelect Agilent) permet la capture de 5.3Mb, soit 32146 exons de 1666 gènes candidats codant pour des protéines ciliaires, sélectionnés à l'aide des banques de données du cil (ciliaproteome et cildb) et d'après les modèles cellulaires et animaux rapportés dans la littérature tels que : les souris (Liu et al., 2005) rat (Baker et al., 2008), homme (Nogales-Cadenas et al., 2009; Ross et al., 2007) et *C. elegans* (Blacque et al., 2005). Cette librairie résulte de l'optimisation de la 1^{ère} librairie Surselect ciblée de 1211 gènes initialement

utilisée. Cette seconde librairie a bénéficié d'une couverture supplémentaire des exons riches en GC (>65%), d'une diminution du nombre des sondes pour les exons très bien couverts, de nouveaux transcrits et de l'apport de nouveaux gènes. Le multiplexage des échantillons à l'aide de codes barres et l'augmentation des capacités des séquenceurs de nouvelle génération nous permettra de séquencer l'exome ciliaire de 14 à 16 échantillons puis de 128 ciliomes simultanément.

La préparation des échantillons pour la stratégie d'exome se fait de la même manière que l'exome ciliaire.

b. Préparation des banques d'ADN

L'ADN est fragmenté par sonication aux ultrasons en fragments d'une centaine de paires de bases (150-180 pb). L'ADN fragmenté est réparé aux extrémités afin d'ajouter par ligation deux adaptateurs différents. Dans certaines méthodes, les ADN peuvent être mélangés grâce à l'ajout d'un adaptateur contenant une séquence spécifique appelée code barre. Ce code barre sera séquencé par la suite pour pouvoir attribuer le fragment à l'échantillon correspondant. L'utilisation d'un mélange d'échantillons portant des codes barres permettra de simplifier les étapes en aval et d'augmenter la capacité du séquençage en termes de nombre d'échantillons analysés de façon simultanée.

c. Capture par hybridation en phase liquide

Pour capturer des régions génomiques d'intérêt, en utilisant la capture en solution, l'objectif est de mélanger des oligonucléotides (sondes) synthétiques à un échantillon d'ADN génomique fragmenté. La technologie de la société Agilent (Technologie SureSelect) propose l'hybridation de l'ADN avec des sondes d'ARN biotinylées de 120pb (Gnirke et al., 2009). Les sondes, étiquetées avec de la biotine, s'hybrident sélectivement aux régions génomiques d'intérêt, après quoi, les complexes ADN génomique/sonde peuvent être capturés grâce à des billes magnétiques couplées à de la streptavidine. Puis, elles sont ensuite lavées pour éliminer les ADN hybridés de manière non spécifique. Les fragments d'ADN sont ensuite élués puis séquencés. La capture en solution, qui nécessite beaucoup moins d'ADN génomique (3 µg contre 10 à 20 µg) et permet de traiter plusieurs échantillons en parallèle, a supplanté la capture sur support solide.

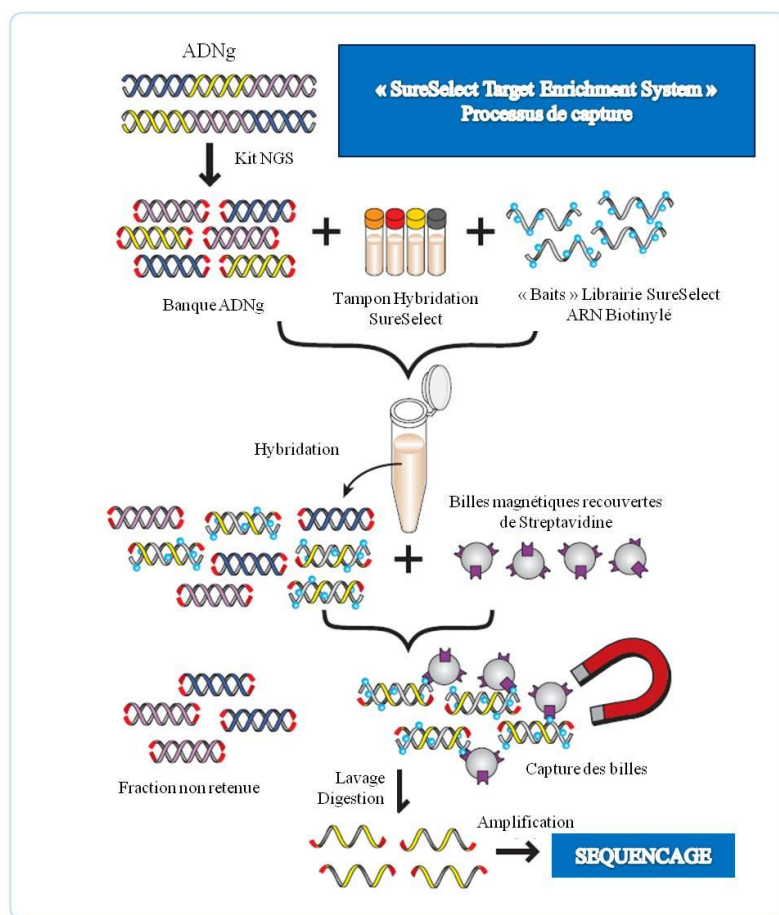


FIGURE 17 : PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE SURESELECT D'AGILENT

d. Séquençage de nouvelle génération

Je vais développer les différentes étapes de ces stratégies de nouvelle génération selon la société Life Technologies.

Life Technologies a commercialisé sa technologie en 2007 : il s'agit de SOLiD™ pour Support Oligonucleotide Ligation and Detection. Le séquençage est en effet basé sur la lecture de courts fragments par un procédé de ligation en chaîne et détection des bases par un système d'encodage à deux couleurs. Cette approche a été développée dans le laboratoire de George Church et publiée en 2005 avec un nouveau séquençage du génome d'*Escherichia coli*. La préparation des échantillons consiste dans l'amplification des fragments d'ADN par PCR en émulsion (emPCR). Avec la technologie SOLiD™, des billes sont fixées de façon covalente sur une lame de verre. Trois configurations de dépôt sont possibles : les billes peuvent être déposées sur toute la surface de la lame, sur 4 cadrans ou sur 8 cadrans.

➤ ***Etapes 1 et 2: Amplification clonale sur billes par PCR en émulsion et enrichissement des billes.***

Cette étape permet d'amplifier par PCR en émulsion et de façon clonale les fragments d'ADN sur des billes. Ces billes font environ 1 μm et sont couplées avec l'une des amorces. L'émulsion (gouttelettes de tampon aqueux en suspension dans l'huile) contient une phase aqueuse constituée des réactifs de PCR, de l'ADN et des billes d'une part; et une phase huileuse d'autre part. Les amorces utilisées sont complémentaires aux adaptateurs fixés aux extrémités de l'ADN. Les deux phases, huile/phase aqueuse, sont mélangées. La quantité de billes et les molécules d'ADN utilisées pour la PCR en émulsion sont optimisées de façon à obtenir le plus possible de microréacteurs qui contiennent un seul fragment d'ADN et une bille afin de n'avoir que des billes monoclonales, car si plusieurs ADN sont présents dans un seul microréacteur, il y aura formation de billes polyclonales générant alors de mauvais résultats de séquençage. L'émulsion de l'ADN est amplifiée dans des conditions de PCR classique. Les microréacteurs résistent à la chaleur et resteront stables pendant toute la durée de l'amplification. En fin d'amplification, 30 000 copies de la matrice de départ sont amplifiées sur chaque bille. L'émulsion est ensuite cassée grâce à du butanol pour dissocier les deux phases. En pratique, en fin de PCR en émulsion, seulement 30 % des billes seront couvertes d'ADN. L'étape d'enrichissement consiste à éliminer le plus possible de billes ne portant pas d'ADN. Pour augmenter le nombre de billes recouvertes d'ADN, des billes dont les surfaces sont recouvertes de polystyrène et possédant une extrémité complémentaire à l'un des adaptateurs sont utilisées. Seules les billes amplifiées seront capturées et les billes sans ADN seront éliminées. Cette étape d'enrichissement permet d'augmenter la proportion de billes portant de l'ADN à 80% des billes totales. L'extrémité 3' de l'ADN est ensuite modifiée chimiquement pour permettre l'adhésion covalente au support de séquençage. Le dépôt des billes s'effectue sur une lame de verre recouverte d'un revêtement spécial permettant la fixation covalente de l'ADN portant cette modification en 3'.

➤ Etape 3 : Réaction de séquence

La technologie SOLiD™ est basée sur une synthèse par ligation et non par polymérisation de l'ADN. Elle utilise la fluorescence comme mode de détection avec 4 fluorophores différents. Pour le séquençage, la plupart des systèmes de détection avec 4 fluorophores utilise un encodage de l'ADN à 1 base : 1 fluorophore correspondra à 1 des 4 bases. La méthode de séquençage du SOLiD™ utilise quant à elle un encodage à 2 bases : 1 fluorophore correspondra à un enchaînement de 2 bases. Avec 16 combinaisons possibles de 2 bases, chacun des 4 fluorophores correspondra à 4 dimères possibles (figure 18). La ligation est réalisée à l'aide de sondes d'interrogation spécifique. Chaque sonde est un octamer, qui se compose de 3' vers 5' : de 2 bases spécifiques, les bases de l'encodage suivies de 6 bases dégénérées puis d'un des quatre marqueurs fluorescents. La nature du marqueur final sera fonction de la séquence des 2 premières bases. Ces octamers fluorescents présentent entre leur 5^{ème} et leur 6^{ème} base un site de coupure par une nucléase.

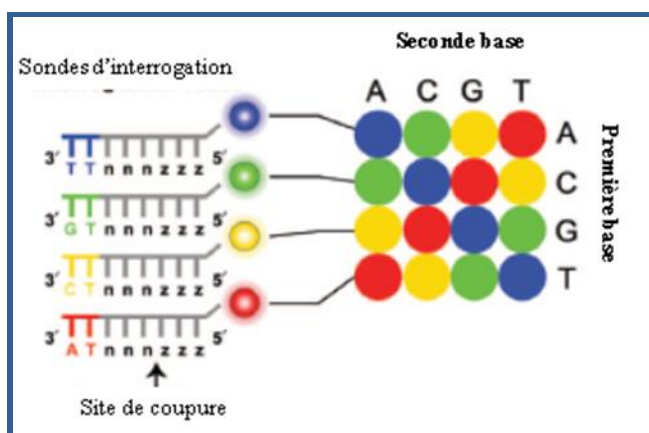


FIGURE 18 : ENCODAGE DE QUATRE COULEURS DES DIMERES DE BASES UTILISE POUR LE SEQUENÇAGE SOLiD™

Le séquençage est réalisé en faisant se succéder les 5 étapes suivantes qui se décomposent en plusieurs cycles de ligation. Le nombre de cycles de ligation dépendra de la longueur des lectures à atteindre. Pour séquençer 35 bases consécutives, 7 cycles de ligations seront nécessaires. Pour séquençer 50 bases consécutives, il faudra faire 10 cycles de ligations.

~ *Etape 1 : Amorçage de la ligation à partir de la position (n).*

Chaque tour commence avec l'ajout d'une amorce P1-universelle (n) complémentaire préalablement hybridée sur l'ADN simple brin. Le 1er cycle de ligation, qui consiste en un mélange d'octamers fluorescents contenant toutes les combinaisons de séquences possibles, est ajouté. Seuls les octamers complémentaires pourront se liguer. Dans l'exemple donné ci-dessous, les 2 bases spécifiques complémentaires étant AT, l'octamer porte le fluorochrome rouge. A cette étape, la lame est scannée et l'image analysée afin de déterminer la nature et l'intensité de la fluorescence, émise au niveau de chaque clone. Puis les octamers sont clivés au niveau de leur site de coupure spécifique situé entre les bases 5 et 6, éliminant ainsi les 3 dernières bases. L'extrémité 5' de la sonde clivée est phosphorylée pour rendre possible la ligation d'un autre octamer au cycle de ligation suivant (Figure 19A et B). Le 2e cycle de ligation, qui consiste en un mélange d'octamers fluorescents, est ajouté pour répéter toutes les étapes décrites précédemment. Après ce 2e cycle et le clivage, l'amorce (n) initiale est allongée de 10 bases. Toutes ces étapes sont répétées de nouveau en autant de cycles de ligation que nécessaire (Figure 19C). Le 7e cycle de ligation est une extension complète de l'amorce (n) sur le brin d'ADN matrice. Nous obtenons in fine des séquences de 35 bases une fois la totalité des cycles de ligation effectuée (Figure 19D).

~ *Etape 2 : Amorçage de la ligation à partir de la position (n-1)*

Après dénaturation (Figure 19E), le produit total de l'amorce (n) est éliminé et un nouveau cycle d'hybridation/ligation commence avec une amorce qui s'hybride en (n-1) puis (n-2), (n-3) et (n-4) par rapport à l'extrémité 3' de P1.

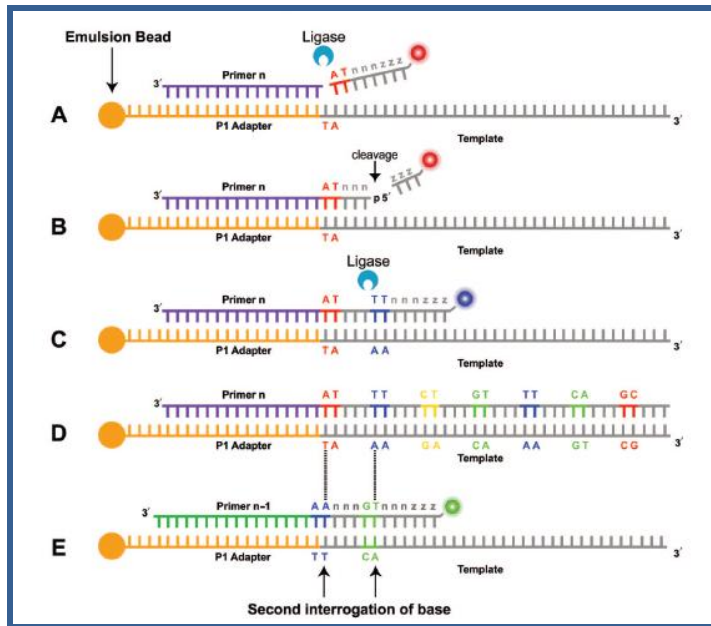


FIGURE 19 : PRINCIPE DE LIGATION ET CLIVAGE EN CHAÎNE DE LA TECHNOLOGIE SOLiD™ (SEQUENÇAGE DE 35 BASES)

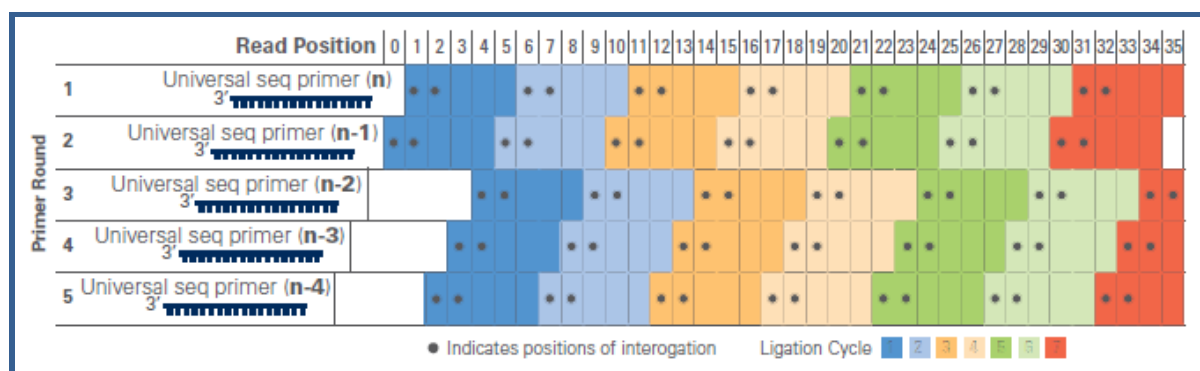


FIGURE 20 : DIFFERENTES BASES INTERROGÉES POUR CHAQUE PRIMER ET LIGATION POUR UN FRAGMENT DE 35 BP

La base en position 0 qui correspond au dernier nucléotide de l'adaptateur est connue (c'est un T). Cette information fournit le point de départ pour reconstituer toute la séquence à partir de l'algorithme du code couleur. Nous obtenons grâce à ce code une séquence en bases (Figure 20). La technologie utilise ensuite des logiciels d'analyse adaptés pour remonter jusqu'à la séquence en base (Figure 21).

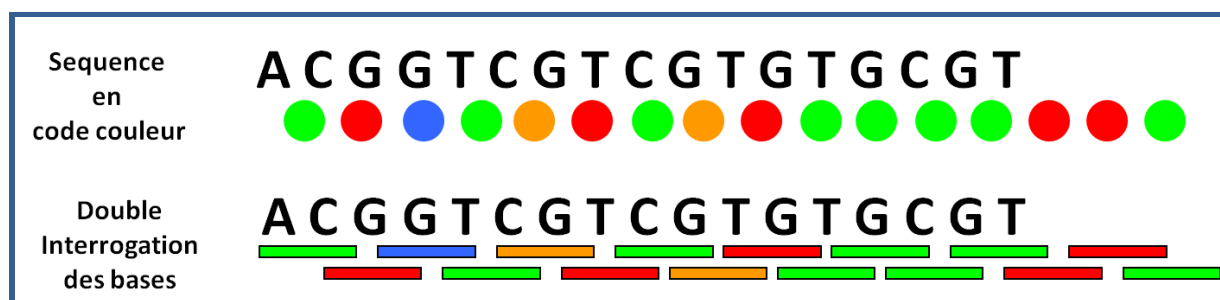


FIGURE 21 : RECONSTITUTION DE LA SEQUENCE EN BASE A PARTIR DU CODE COULEUR

Comme l'indiquent les points noirs sur la figure 20, grâce à l'utilisation de 5 amorces différentes, chaque base à chaque position est en fait interrogée 2 fois en utilisant 2 amorces initiales différentes. Alors qu'en théorie 4 amorces décalées auraient été suffisantes pour décoder la séquence, l'utilisation d'une 5^{ème} amorce constitue un point de contrôle qui permettra de corriger une partie des erreurs de séquence.

Le système de séquençage par ligation n'est pas le plus direct mais permet d'obtenir une qualité de séquence beaucoup plus élevée qu'avec les autres technologies, du fait de la redondance de lecture des bases.

IV. RESULTATS

1. Etudes cliniques et moléculaires des patients atteints de la Dystrophie Thoracique de Jeune et corrélation génotype-phénotype

(Article 1)

Ces travaux ont fait l'objet d'un article dont je suis co-premier auteur, soumis au Journal of Medical Genetics et dont les principaux résultats sont les suivants :

Au sein des 39 familles DTJ, nous avons identifié des **mutations** dans le gène *DYNC2H1* chez 23 familles sur 39 (59%). Nous avons identifié 33 mutations distinctes (avec 25 nouvelles mutation) dont :

- ~ 21 mutations faux-sens (c.6679A>G, p.Met2227Val ; c.10732T>A, p.Phe357Ile ; c.6161G>C, p.Cys2054Ser ; c.6444T>A, p.Leu2115His ; c.9044A>G, p.Asp3015Gly ; c.6035C>T, p.Ala2012Val ; c.124000T>C, p.Trp4134Arg ; c.11221T>C, p.Ser3741Pro ; c.2087A>C, p.His696Pro ; c.4610A>G, p.Gln1537Arg ; c.8617A>G, p.Met2873Val ; c.7981C>T, p.Arg2661Cys ; c.8457A>G, p.Ile2819Met ; c.1759C>T, p.Arg587Cys ; c.7148C>T, p.Thr2383Met ; c.535T>G, p.Trp179Gly ; c.6161G>C, p.Cys2054Ser ; c.3719T>C, p.Ile1240Thr ; c.11284A>G, p.Met3762Val ; c.10669T>C, p.Ser3557Pro ; c.7594C>T, p.Arg2532Trp).
- ~ 4 mutations de type insertion, délétion avec un décalage du cadre de lecture (c.5220delT, p.Phe1740LeufsX26 ; c.2749_2750delCTinsG, p.Thr917ArgfsX1 ; c.654_655ins29bp, p.Glu219LeufsX2 ; c.8283delT, p.Phe2761LeufsX19 ;)
- ~ 6 mutations non-sens (c.5176C>T, p.Arg1726* ; c.10606C>T, p.Arg3536* ; c.2549T>A, p.Leu850* ; c.6043C>T, p.Arg2015* ; c.10063G>T ; p.Gly3355* ; c.4409C>A, p.Ser1470*)
- ~ 1 mutation intronique qui induit la création d'un site d'épissage d'après le programme de prédiction ALAMUT (c.9353+1G>A).

Toutes les mutations faux-sens n'ont pas été retrouvées chez 200 chromosomes contrôles, sont décrites comme damaging dans Alamut et sont responsables du changement d'acide aminé conservé au sein des espèces. Parmi ces mutations, 16 sont présentes à l'état hétérozygote composite, et deux sont présentes à l'état homozygote. Dans une famille (L9), une mutation homozygote (c.10669T>C) a été identifiée chez le patient L9 dans l'exon 71 héritée de la mère et non retrouvée chez le père. Ceci suggère la présence d'une délétion de

l'exon 71 chez le père. Ce résultat a été confirmé par l'analyse FISH chez le patient L9 ainsi que chez son père (Del FISH probe RP11-2I22). Enfin, une seule mutation hétérozygote a été identifiée dans six familles. Aucun patient ne présente deux mutations non-sens. Des mutations fréquentes dans le gène *DYNC2H1* ont été identifiées dans les exons suivants: 12, 25, 30, 38, 39, 42, 56 et 57.

Nous avons par ailleurs identifié 3 mutations à l'état hétérozygote (5%) dans *IFT80* dans deux familles sur 39 dont :

- ~ une famille présente deux mutations dont l'une faux-sens et l'autre une mutation intronique (c.428C>T, p.Leu143Ser et c.958-2A>G respectivement)
- ~ une famille présente une mutation faux-sens : c.2155C>T, p.Arg719Cys

Nous avons exclu *DYNC2H1* et *IFT80* dans 14 familles sur 39 soit 36%.

Sur le **plan clinique**, l'analyse des données foetopathologiques des 30 fœtus montrent que des interruptions de grossesse (IMG) ont été effectuées sur la base d'une échographie prénatale avec :

- ~ 23% diagnostiqués DTJ sévère
- ~ 30% diagnostiqués dysplasie squelettique non spécifique ou nanisme thanatophore.
- ~ 47% sur signes d'appel échographique tels qu'une étroitesse thoracique sévère ou des os longs courts

De plus, 23% présentent une polydactylie post-axiale, 33% des anomalies rénales, et 26% des anomalies hépatiques. D'autres malformations sont présentes telles que : i) situs inversus ii) fente labio-palatine iii) micropenis iv) des kystes pancréatiques v) des anomalies de segmentation pulmonaire.

Chez les 23 cas vivants, le diagnostic de DTJ a été évoqué en anténatal dans deux cas et à la naissance chez 13 patients. Pour les huit cas restants, le diagnostic de DTJ a été porté entre 1 mois et 9 ans.

Une insuffisance respiratoire est présente à la naissance chez 47% des cas (11/23). Une hospitalisation pendant au moins 3 semaines a été nécessaire chez 26% des cas. 21% ont subi une trachéotomie, 13% ont subi une ventilation non-invasive, et 8% ont subi une expansion pulmonaire due à l'insuffisance respiratoire. Pour les adolescents et adultes de la série, une amélioration de l'étroitesse thoracique après la puberté est notée.

Des anomalies rénales sont présentes chez 17% des cas (4/23) allant d'insuffisance rénale sévère conduisant à une transplantation rénale à l'âge de 20 ans à des kystes rénaux détectés à l'âge de 3-5 ans. 22% des cas ont des anomalies hépatiques comprenant soit une élévation

isolée des γ -glutamyltransférases, ou des tableaux plus sévères de fibrose à l'âge de 14 ans ou stéatose.

Un électrorétinogramme a été réalisé chez tous les enfants de plus de 5 ans (16) et huit d'entre eux (50%) ont une altération de leur électrorétinogramme.

Trois patients sur 23 (13%) ont à la fois des anomalies rénales et hépatiques, deux patients (9%) ont des anomalies rénales et rétinienne, quatre patients sur 23 (17%) ont des anomalies hépatiques et des altérations rétiniennes.

Parmi les autres caractéristiques cliniques et radiologiques:

- ~ On note une polydactylie post-axiale chez 9%.
- ~ 74% (14/23) ont une taille normale alors que 26% (6/23) ont un retard statural postnatal et 17% (4/23) ont une taille au dessus de la normale (1m50 à 1m78).
- ~ Une brachydactylie avec des épiphyses en cônes chez 7/23 patients (30%).
- ~ Une hypotonie musculaire observée chez 44% durant les premiers mois de vie
- ~ Des manifestations orthopédiques chez 26% (6/23) avec scoliose et instabilité cervicale
- ~ Une obésité chez trois patients

Nous avons tenté d'établir des **corrélations génotype-phénotype**. Parmi les 26 cas ayant deux mutations dans *DYNC2H1*, nous avons observé :

- ~ Une faible fréquence d'atteinte rénale (7,7% des cas soit 2/26)
- ~ Une faible fréquence d'atteinte hépatique (11,5% des cas soit 3/26)
- ~ Une relative forte fréquence d'atteinte rétinienne (29% des cas soit 2/7)
- ~ Une taille normale entre -1SD et + 2SD.
- ~ L'absence d'épiphyses en cône au niveau des mains

En revanche, parmi les patients non mutés dans *DYNC2H1*, nous avons observé chez 3 d'entre eux :

- ~ Une atteinte rénale
- ~ Une brachydactylie prononcée avec des épiphyses en cône
- ~ Un retard statural

Asphyxiating Thoracic Dysplasia: clinical and molecular review of 39 families

Geneviève Baujat^{1*}, Céline Huber^{1*}, **Joyce El Hokayem^{1*}**, Roseline Caumes¹, Claire Do Ngoc Thanh², Albert David³, Anne-Lise Delezoide⁴, Anne Dieux-Coeslier⁵, Brigitte Estournet², Christine Francannet⁶, Honorine Kayirangwa¹, Florence Lacaille⁷, Muriel Le Bourgeois⁸, Jelena Martinovic⁹, Rémi Salomon¹⁰, Sabine Sigaudy¹¹, Valérie Malan¹, Arnold Munnich¹, Martine Le Merrer¹, Kim Hanh Le Quan Sang¹, Valérie Cormier-Daire¹

¹ Département de Génétique et INSERM U781, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Fondation Imagine, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

² Médecine Physique et Réadaptation de l'Enfant, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France

³ Service de Génétique Médicale, CHU de Nantes, Nantes, France

⁴ Service de Biologie du Développement, Université Paris Diderot-Sorbonne Paris Cité, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France

⁵ Clinique de Génétique Guy Fontaine, CHRU, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille, France

⁶ Service de Génétique Médicale, Hôpital Hotel Dieu, Clermont Ferrand, France

⁷ Service d'Hépatologie-Gastroentérologie-Nutrition, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

⁸ Département of de Pneumologie et Allergologie, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

⁹ Unité de Foetopathologie, Université Paris Sud, Hôpital Antoine Bécère, APHP, Paris, France

¹⁰ Service de Néphrologie Pédiatrique et U574, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

¹¹ Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfant de la Timone, Marseille, France

* Equally contributors

Abstract

Background: Asphyxiating Thoracic Dysplasia (ATD) belongs to the short rib polydactyly group and is characterized by a long and narrow thorax, short long bones and trident acetabular roof. Other features have been reported including polydactyly, renal, liver and retinal involvement. To date, mutations in *IFT80*, *DYNC2H1*, *TTC21B* and *WDR19* genes have been reported in ATD. The clinical and molecular heterogeneity leads to difficulties in the evaluation of the long-term prognosis.

Methods: We investigated 53 ATD cases from 39 families, including 23 living cases ranging in age from 6 months to 48 years and 30 fetuses. They benefited from a combined approach of deep phenotyping and *IFT80* and *DYNC2H1* molecular screening.

Results: Among the 23 postnatal cases, significant pulmonary insufficiency was noted in 60% of cases, with tracheotomy requirement in five cases. Renal and liver diseases occurred respectively in 17% and 22% of cases, whereas retinal alteration was present in 50% of cases aged more than 5 years. The molecular screening allowed the identification of *DYNC2H1* mutations in 23 families (59%) and *IFT80* mutations in two families (5%). However, in six families, only one heterozygote mutation in either *IFT80* or *DYNC2H1* was identified. Finally, the two genes were excluded in 14 families (36%).

Conclusion: These results demonstrate that *DYNC2H1* is a major gene responsible for ATD, while *IFT80* is rarely involved. The presence of only one mutation in six families and the exclusion of the two genes in 14 families support the involvement of other causal cilia genes. The long-term follow up emphasizes that the pulmonary prognosis is probably less pejorative and retinal involvement more frequent than previously thought. Follow up guidelines are proposed.

Introduction

Asphyxiating Thoracic Dysplasia (ATD, Jeune syndrome, MIM 208500) is an autosomal recessive chondrodysplasia characterized by narrow thorax, trident acetabular roof, inconstant polydactyly and limb shortening associated with possible renal, hepatic, pancreatic and retinal manifestations occurring in the course of the disease (Jeune et al., 1955). This disease has a wide spectrum of severity ranging from mild form to lethal condition and overlaps with the Short Rib Polydactyly (SRP) Type III (Verma-Naumoff) (Dagoneau et al., 2009; Ho et al., 2000; Merrill et al., 2009). In the severe form, respiratory failure leads to death in early infancy. The frequency and age of onset of extra-osseous manifestations are hitherto unknown. The identification of *IFT80* (IntraFlagellar transport 80, MIM 61177) mutations in ATD has first confirmed that ATD belongs to the spectrum of cilia disorders [7]. More recently, mutations in *DYNC2H1* (dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1, MIM 603297), *TTC21B* (Tetratricopeptide repeat containing Hedgehog Modulator 1, MIM 612014) and *WDR19* (WD Repeat-Containing Protein 19, MIM 608151) have been reported in ATD cases (Bredrup et al., 2011). *IFT80* encodes a 777 residue protein that contains seven WD40 domains and is a component of intraflagellar transport complex B which is involved in the anterograde transport toward the ciliary tip allowing the elongation and the maintenance of the primary cilia (Beales et al., 2007). *DYNC2H1* encodes a subunit of cytoplasmic dynein complex, a component of intraflagellar transport A involved in the retrograde transport from the ciliary tip to the basal body of the ciliary axoneme and plays a role in the maintenance of the primary cilia and the recycling of the ciliary protein (Dagoneau et al., 2009; Merrill et al., 2009). *TTC21B* encodes the retrograde IFT139 protein and causes both isolated nephronophtosis and ATD (Davis et al., 2011). Finally, *WDR19* encodes retrograde IFT144 of IFT complex A, involved in nephronophtosis, cranioectodermal syndrome and ATD (Bredrup et al., 2011).

Through a national grant funded in 2007 for three years (PHRC AOM 06031), we investigated 53 ATD cases. The aim of the study was 1) to better describe the natural history of the disorder and evaluate the frequencies of skeletal and extra-skeletal complications 2) to perform the molecular screening of *IFT80* and *DYNC2H1*, which were the only genes identified in 2009.

Methods

The study was promoted by Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), approved by the Institutional Ethic Committee (CPP-Ile de France 2) and registered at the National Health Authority (AFSSAPS) and at the International Protocol Registration System (ClinicalTrials.gov, NCT00948376).

53 ATD cases including 30 fetuses and 23 living cases, belonging to 39 families, were recruited between 2007 and 2009. Among these 39 families, six were consanguineous. They originated from France (31), Portugal (2), Turkey (2), Germany (1), Algeria (1), Morocco (1) and Poland (1).

The 30 fetuses, from 18 families, included 15 females and 15 males, issued of terminated pregnancies (TP) between 14 and 35 weeks of gestation (WG) with a mid-term of 25 WG (Table 1). Nine families underwent for two or three TP because of recurrence. They fulfilled the diagnosis criteria for ATD namely: 1) marked short ribs, severe constricted thoracic cage, trident acetabular roof, shortening of long bones 2) available detailed foetopathological report 3) available DNA samples for the proband and his parents. Exclusion criteria were clinical or radiological features suggestive of other SRP types.

The 23 living patients, from 23 families, included 8 girls and 15 boys, ranging in age from six months to 48 years (mean age 10.6 years) at the beginning of the study. Among them, two families had TP for recurrence (Tables 1 and 2, F15/L19 and F10/L13). They fulfilled the diagnosis criteria for ATD namely: 1) short ribs with narrow thorax, trident acetabular roof, variable long bones shortening 2) availability of DNA samples for the proband and his parents. We excluded patients with Ellis van Creveld (EVC) syndrome features such as ectodermal defects or oro-facio-digital (OFD) syndrome features. Complete clinical follow up data were recorded for all postnatal patients. The deep phenotyping study consisted in physical examination with measurements, skeleton X-rays, hepatic, renal, pancreatic biological function, abdominal and heart ultrasound. Pulmonary functional evaluation (including spirometry and volumes) and electroretinogram were performed only in children older than 5 years.

For molecular studies, genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA blood midi/maxi kit (Qiagen S.A., sample and assay technology, France). HEX or FAM fluorescently labeled PCR products were run on an ABI 3130 sequencer and analyzed using GeneMapper (Applied Biosystems). Linkage analysis was first performed in all consanguineous families and with recurrent sibs using microsatellite markers of the ABI PRISM linkage mapping set (Applied Biosystem) at the *IFT80* and *DYNC2H1* locus (Microsatellite markers available on request). For the concordant haplotyped cases and for the other non-consanguineous/non-recurrent cases, *IFT80* and *DYNC2H1* exons and flanking intron sequences were amplified from patient DNA by PCR using 20 pairs of primers for *IFT80* and 90 pairs of primers for *DYNC2H1* designed with the Primer 3 software or UCSC Genome Browser database (See Web Resources). To amplify the 20 coding exons of *IFT80* and the 90 coding exons of *DYNC2H1* (sequence available on request), we purified

the PCR product with exonuclease I (ExoSAPIT; Amersham Bioscience, USA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were performed on both strands and run on an automatic sequencer (ABI 3130) using the BigDye Terminator cycle sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and then analyzed by sequencing analysis (Applied Biosystems).

All families provided written informed consent for clinical and molecular studies, approved by our local Research Ethics Committee.

Results

The clinical, biological and molecular results are listed in Table 1 for fetuses and Table 2 for postnatal cases.

For the 30 fetuses, TP was based on prenatal ultrasound survey with i) a diagnosis of severe ATD in 7/30 cases (after 25 WG in six and at 22 WG in one) ii) a diagnosis of non-specified severe skeletal dysplasia or thanatophoric dysplasia in 9/30 iii) detection of short ribs and short long bones in recurrence in 14/30 (at 14 WG for 1 and between 15-26 WG for 13). Postaxial polydactyly was present in 7/30 (23%). Renal abnormalities were observed in 10/30 cases (33%, 7/18 families) including cysts (4), hydronephrosis (4) or renal dysplasia (2). Hepatic abnormalities were observed in 8/30 (26%, 6/18 families) including portal fibrosis (6), portal spaces dilatation and bile duct agenesis (1). Other features were: situs inversus (1), cleft palate (2), pulmonary segmentation abnormalities (2), micropenis (1), and pancreas cyst (1).

Among the 23 postnatal cases, only two were diagnosed as ATD antenatally and 13 were diagnosed at birth. In the eight remaining cases, the diagnosis was performed between one month and nine years of age. However, 14/23 had prenatal skeleton features, detected by ultrasound survey, including short long bones (11), bowing of the femora (2), short ribs (6) and trident acetabular roof (2). Clinically, all patients presented disproportioned chest narrowing but variable in severity and deformity (Figure 1A and 1B). Neonatal respiratory insufficiency was noted in 11/23 (47%) and respiratory support for more than three weeks was required in six cases (26%). In infancy, 15/23 (65%) presented significant pulmonary complications (such as recurrent infections or asthma symptoms). In the course of the disease, five required long term tracheotomy (21%), three required noninvasive positive pressure ventilation (13%). Two patients underwent chest expansion procedures for severe respiratory insufficiency. In the four adult patients, a significant improvement of the chest narrowing was noted after puberty.

Renal manifestations were observed in 4/23 patients (17%) including renal failure with transplantation after 20 years (2) and renal cysts diagnosed at three and five years (2). 5/23 (22%) presented liver abnormalities, namely increased γ glutamyl transferase (γ GT) (2), liver fibrosis at 14 years old (1) and steatosis associated with renal failure (1). Electroretinogram alteration was found in eight cases among the 16 cases older than five years (50%). Combination of renal and liver abnormalities was observed in 3/23, kidney and retina alteration in 2/23, and liver and retina alteration were observed in 4/23 (Table 2). Postaxial polydactyly was noted in 2/23 (9%). Birth heights were normal in all and 17/23 patients (74%) were in the normal range while 6/23 presented postnatal short stature. The four adults of the series had a subnormal height, ranging from 1.50m to 1.78m. All patients had some degree of brachymetacarpia (figure 1C). Marked brachydactyly with cone shaped epiphysis were observed in 7/23 patients. Muscular hypotonia was observed in the first months of life in 44% cases with secondary improvement. We also observed orthopedics features in 6/23, including scoliosis (3), C1-C2 narrowing (1) and lumbar spine stenosis (3). One patient underwent for early hip replacement at 28 years of age because of epiphyseal dysplasia. Obesity was noted in three patients. Cognitive development was normal apart from one patient who had minor school difficulties.

Among the 39 families (53 cases), 23 families (59%) (i.e. 18/30 fetuses, 60% and 14/23 living patients, 61%) had *DYNC2H1* mutations, including compound heterozygous mutations in 16, homozygous mutations in 2 and only one heterozygous mutation in five families (Tables 1 and 2). We identified 33 distinct mutations (with 25 novel mutations) including 21 missense, four frameshift, six nonsense and one splice site mutations (figure 2). Case L9 presented by sequencing analysis the c.10669T>C mutation (exon 71) at the homozygote state. This mutation was identified only in the mother at the heterozygote state, leading us to assume an exon 71 deletion inherited from the father. The deletion was confirmed by FISH analysis using the probe RP11-2122 in L9 and his father. No cases with two heterozygous or homozygous nonsense mutations were identified. Mutations were located throughout the gene, without any hotspot and recurrent mutations were located in exons 12, 25, 30, 38, 39, 42 and 56-57. In two families, we identified *IFT80* (5%) mutations including one missense and one splice site (F11), and only one missense mutation in one patient (L15, Figure 3). For both genes, missense mutations were responsible for the change of conserved amino-acid across species (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>), not present in 200 control chromosomes and predicted as damaging using the Alamut software (See Web resources). Finally, *DYNC2H1* and *IFT80* were excluded in 14 families.

Discussion

We report here the clinical and molecular study of a series of 53 ATD patients from 39 families. This series confirms the prevalence of ATD in France (Keppler-Noreuil et al., 2011). Within the SRP group, ATD is one of the less rare conditions. 42 ATD cases were diagnosed (TP or after birth) between 2004 and 2010 and referred to the national Reference Center for skeletal dysplasia. Considering the non-referred and missed cases, this leads to 1 ATD case out of 100 000 births (annual births rate: 700 000 in France).

In the postnatal period, we observed a significant variability in the severity of respiratory insufficiency from severe to mild forms. Decrease vital capacity was associated with frequent respiratory complications (infections, asthma) and 65% of recurrent pulmonary complications in infancy were observed as previously reported (Keppler-Noreuil et al., 2011; Tuysuz et al., 2009), apart from the Dutch series characterized by 80% cases with respiratory problems in the first two years of life (de Vries et al., 2010). The thoracic perimeter improved with age in the oldest patients and the four adults of the series had a good pulmonary function. No correlation between the pulmonary prognosis and the stature insufficiency was observed and some patients with persistent tracheotomy had a normal stature. The frequency of renal complications (17 %) was almost similar to the recent reported series (0/8 (Keppler-Noreuil et al., 2011), 3/12 (Tuysuz et al., 2009) and 2/13 (de Vries et al., 2010)). However, only a few patients are older than 15 years and the two patients with severe renal involvement presented hypertension after 15 years of age with rapid renal failure supporting the need for a long term follow up. The frequency of liver involvement (26% of living cases) was also similar to previous series (de Vries et al., 2010; Keppler-Noreuil et al., 2011; Labrune et al., 1999) and of good prognosis with spontaneous resolution of liver dysfunction or efficiency of ursodeoxycholic acid treatment. By contrast, we observed a higher frequency of eye alterations (50 %) compared to the literature (Allen et al., 1979; Bard et al., 1978; Keppler-Noreuil et al., 2011; Ring et al., 1990), which might be due to the systematic eye survey performed in patients older than 5 years. We also observed orthopedics features including cervical spine compression, scoliosis and lumbar spine stenosis supporting spine follow up during the course of the disease. All patients had a normal or sub-normal birth height and only 36% developed short stature in the postnatal period. Based on our results and the previously published series, we propose guidelines for the postnatal follow up of ATD patients (Table 3).

We identified 59% of *DYNC2H1* mutations in 39 ATD families supporting that *DYNC2H1* is a major gene for ATD. We confirmed that *ITF80* is rarely involved in ATD, with only 1/39 family with two mutations. Because we identified a fair number of *DYNC2H1*

mutations, we tried to establish genotype-phenotype correlations. Among the 26 cases with two *DYNC2H1* mutations, we observed a low frequency of renal (2/26, cyst) or liver involvement (3/26), polydactyly in 6/26, and a high frequency of retina impairment (2/7, 29%). Other rare features observed were micropenis, situs inversus and microdontia. Stature was always in the normal range between -1 SD and +2 SD. The hands were mildly short, without cone shaped epiphysis. By contrast, the three patients with symptomatic renal involvement presented also marked brachydactyly with cone shaped epiphysis and short stature and none of them had *DYNC2H1* mutation.

The presence of only one heterozygote mutation in six cases may be due to the limit of our molecular screening. One cannot exclude partial intragenic deletions or mutations in the introns or the promoter region. It may also suggest digenic allelic inheritance or the presence of two causal pathogenic mutations in other cilia genes with the heterozygote *DYNC2H1/IFT80* mutation acting as a second site modifier (Bredrup et al., 2011).

For the 26 remaining cases with only one heterozygote mutation or with no mutation, ongoing exome sequencing will hopefully lead to identify other cilia genes. Further correlation genotype-phenotype studies on larger series will be essential to get better prognosis elements that will help families and medical teams in genetic counseling and long-term management of the disease.

Acknowledgements and Grant

We thank all the patients and their families for their contribution to this work. We also thank all the collaborators for their involvement in this project: C. Baumann, E. Bieth, C. Delacourt, L. Faivre-Olivier, E. Flori, D. Gaillard, F. Giuliano, M. Gonzales, M. Holder, B. Le Fiblec, P. Loget, M. Mathieu-Dramard, J. Prota, F. Prieur, C. Quelin, M. Rossi, P. Sarda, B. Troude.

This study was sponsored by *Assistance Publique - Hôpitaux de Paris* (via *DRCD - Ile de France, Hôpital St-Louis*) and was supported by a grant from the *Programme Hospitalier de Recherche Clinique* (PHRC-National, AOM 06031). We thank the Clinical Research Unit, Ambroise Paré Hospital, (Dr. Frédéric Barbot & Pr. Philippe Aegerter) for its logistical support.

Web resources

Alamut-Mutation interpretation software (interactive biosoftware)

Ensembl Human Genome Server, <http://ensembl.org/>

Primer3, <http://frodo.wi.mit.edu/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>

The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.org/>

Competing interests: None

References

1. Allen, A.W., Jr., Moon, J.B., Hovland, K.R., and Minckler, D.S. Ocular findings in thoracic-pelvic-phalangeal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 1979;**97**, 489-492.
2. Bard, L.A., Bard, P.A., Owens, G.W., and Hall, B.D. Retinal involvement in thoracic-pelvic-phalangeal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 1978;**96**, 278-281.
3. Beales, P.L., Bland, E., Tobin, J.L., Bacchelli, C., Tuysuz, B., Hill, J., Rix, S., Pearson, C.G., Kai, M., Hartley, J. IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nat Genet* 2007; **39**, 727-729.
4. Bredrup C, Saunier S, Oud MM, Fiskerstrand T, Hoischen A, Brackman D, Leh SM, Midtbø M, Filhol E, Bole-Feysot C, Nitschké P, Gilissen C, Haugen OH, Sanders JS, Stolte-Dijkstra I, Mans DA, Steenbergen EJ, Hamel BC, Matignon M, Pfundt R, Jeanpierre C, Boman H, Rødahl E, Veltman JA, Knappskog PM, Knoers NV, Roepman R, Arts HH. Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19. *Am J Hum Genet* 2011;**89**:634-43.
5. Dagoneau N, Goulet M, Genevieve D, Sznajer Y, Martinovic J, Smithson S, Huber C, Baujat G, Flori E, Tecco L, Cavalcanti D, Delezoide AL, Serre V, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. *DYNC2H1* mutations cause Asphyxiating Thoracic Dystrophy and Short Rib-Polydactyly Syndrome, Type III. *Am J Hum Genet* 2009;**84**:706-711
6. Erica E Davis, Qi Zhang, Qin Liu, Bill H Diplas, Lisa M Davey, Jane Hartley, Corinne Stoetzel, Katarzyna Szymanska, Gokul Ramaswami, Clare V Logan, Donna M Muzny, Alice C Young, David A Wheeler, Pedro Cruz, Margaret Morgan, Lora R Lewis, Praveen Cherukuri, Baishali Maskeri, Nancy F Hansen, James C Mullikin, Robert W Blakesley, Gerard G Bouffard, NISC Comparative Sequencing Program, Gabor Gyapay, Susanne Rieger, Burkhard Tönshoff, Ilse Kern, Neveen A Soliman, Thomas J Neuhaus, Kathryn J Swoboda, Hulya Kayserili, Tomas E Gallagher, Richard A Lewis, Carsten Bergmann, Edgar A Otto, Sophie Saunier, Peter J Scambler, Philip L Beales, Joseph G Gleeson, Eamonn R Maher, Tania Attié-Bitach, Hélène Dollfus, Colin A Johnson, Eric D Green, Richard A Gibbs, Friedhelm Hildebrandt, Eric A Pierce & Nicholas Katsanis. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat Genet* 2011;**43**, 189-196.
7. de Vries, J., Yntema, J.L., van Die, C.E., Crama, N., Cornelissen, E.A., and Hamel, B.C. Jeune syndrome: description of 13 cases and a proposal for follow-up protocol. *Eur J Pediatr* 2010;**169**, 77-88.
8. Ho, N.C., Francomano, C.A., and van Allen, M. Jeune asphyxiating thoracic dystrophy and short-rib polydactyly type III (Verma-Naumoff) are variants of the same disorder. *Am J Med Genet* 2000;**90**, 310-314.
9. Jeune, M., Beraud, C., and Carron, R. [Asphyxiating thoracic dystrophy with familial characteristics]. *Arch Fr Pediatr* 1955;**12**, 886-891.
10. Keppler-Noreuil, K.M., Adam, M.P., Welch, J., Muilenburg, A., and Willing, M.C. Clinical insights gained from eight new cases and review of reported cases with Jeune syndrome (asphyxiating thoracic dystrophy). *Am J Med Genet A* 2011;**155A**, 1021-1032.
11. Labrune, P., Fabre, M., Trioche, P., Estournet-Mathiaud, B., Grangeponet, M.C., Rambaud, C., Muraige, C., and Bernard, O. Jeune syndrome and liver disease: report of three cases treated with ursodeoxycholic acid. *Am J Med Genet* 1999;**87**, 324-328.
12. Merrill AE, Merriman B, Farrington-Rock C, Camacho N, Sebald ET, Funari V, Schibler MJ, Firestein MH, Cohn ZA, Priore MA, Thompson AK, Rimoin DL, Nelson SF, Cohn DH, Krakow D. Ciliary abnormalities due to defects in the Retrograde Transport Protein *DYNC2H1* in Short-Rib Polydactyly Syndrome. *Am J Hum Genet* 2009;**84**:542-49
13. Ring, E., Zobel, G., Ratschek, M., Trop, M., and Wendler, H. Retrospective diagnosis of Jeune's syndrome in two patients with chronic renal failure. *Child Nephrol Urol* 1990;**10**, 88-91.

14. Tuysuz, B., Baris, S., Aksoy, F., Madazli, R., Ungur, S., and Sever, L. Clinical variability of asphyxiating thoracic dystrophy (Jeune) syndrome: Evaluation and classification of 13 patients. *Am J Med Genet A* 2009;**149A**, 1727-1733.

Figures and Tables legends

Table 1 Summary of clinical and molecular data in the 30 fetuses

Table 2 Summary of clinical and molecular data in the 23 living patients

Table 3 Recommendations for ATD follow-up

Figure 1. 1A. Pictures and 1B X-rays of thorax (A-F). A1-A3 and B1-B3: patients with 2 *DYNC2H1* mutations; C1-C3 patients with only one *DYNC2H1* mutation; D1-D3 patients with no mutation in *DYNC2H1* and *IFT80*. E1-E6: variable thoracic aspects in patients with *DYNC2H1* mutations. 1C. Hands X-rays (F1-F6). Note the mild brachydactyly and hypoplasia of distal phalanges in F1-F3 and the short hands with cone shaped epiphysis in F4-F6



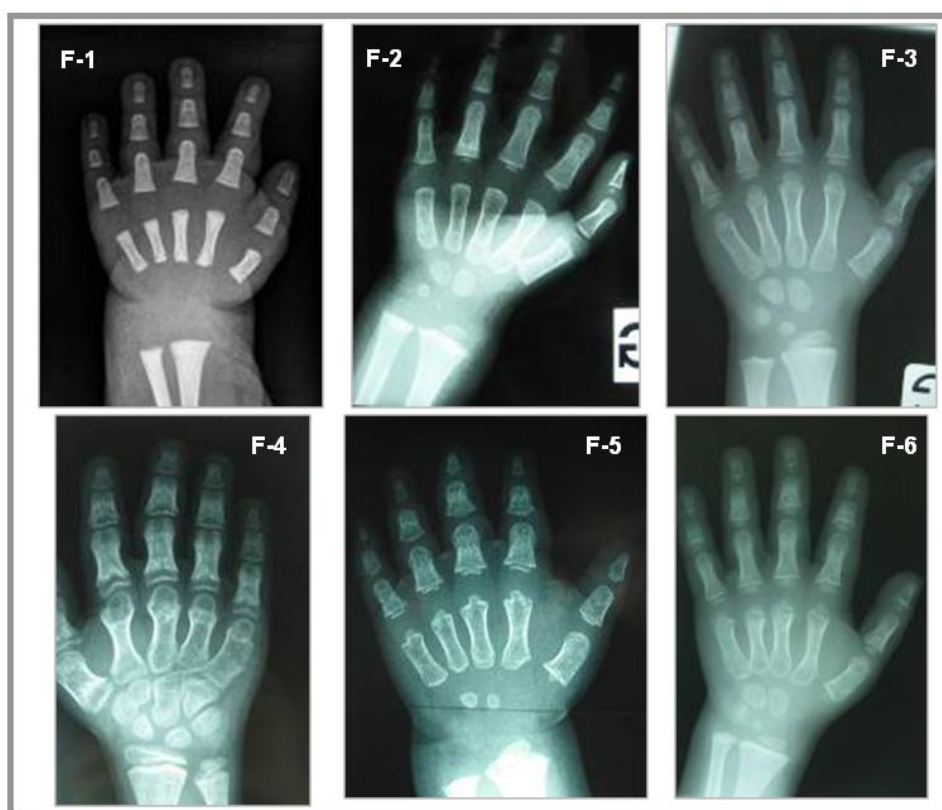
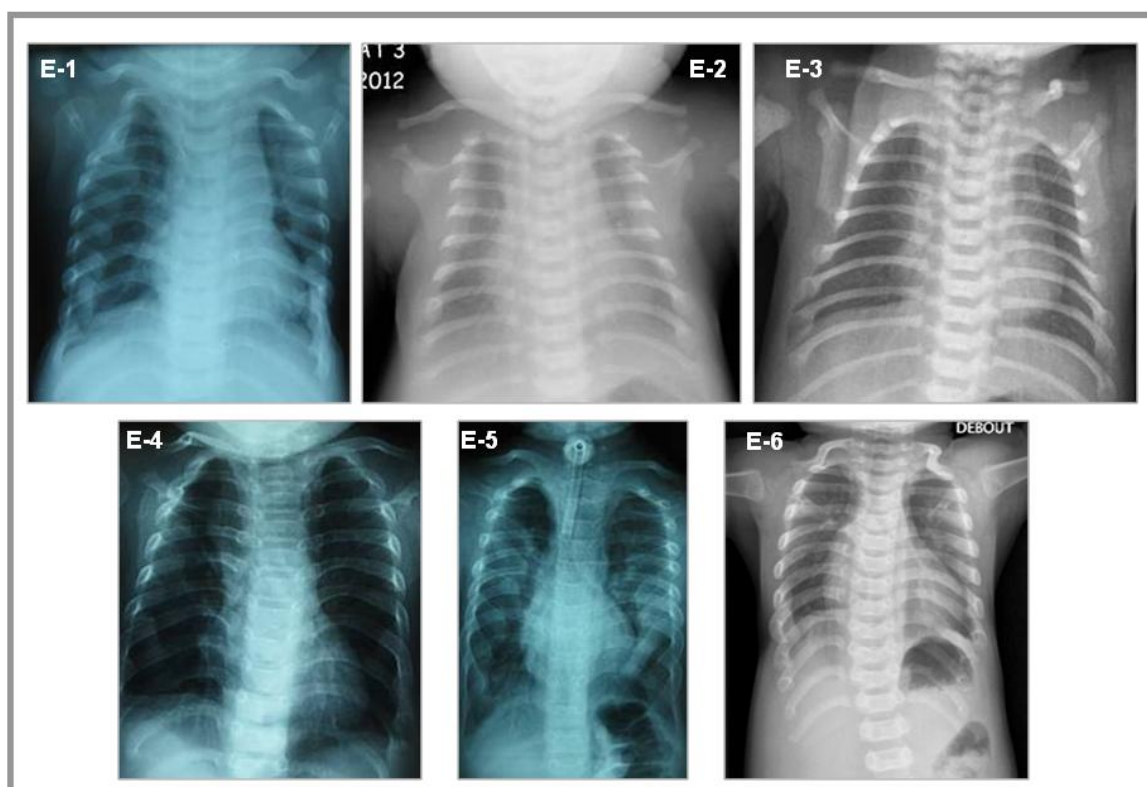


Figure 2 Location of the *DYNC2H1* mutations identified in the series. In bold: novel mutations; In italic: common mutations with Dagoneau et al. 2009 and Merrill et al. 2009

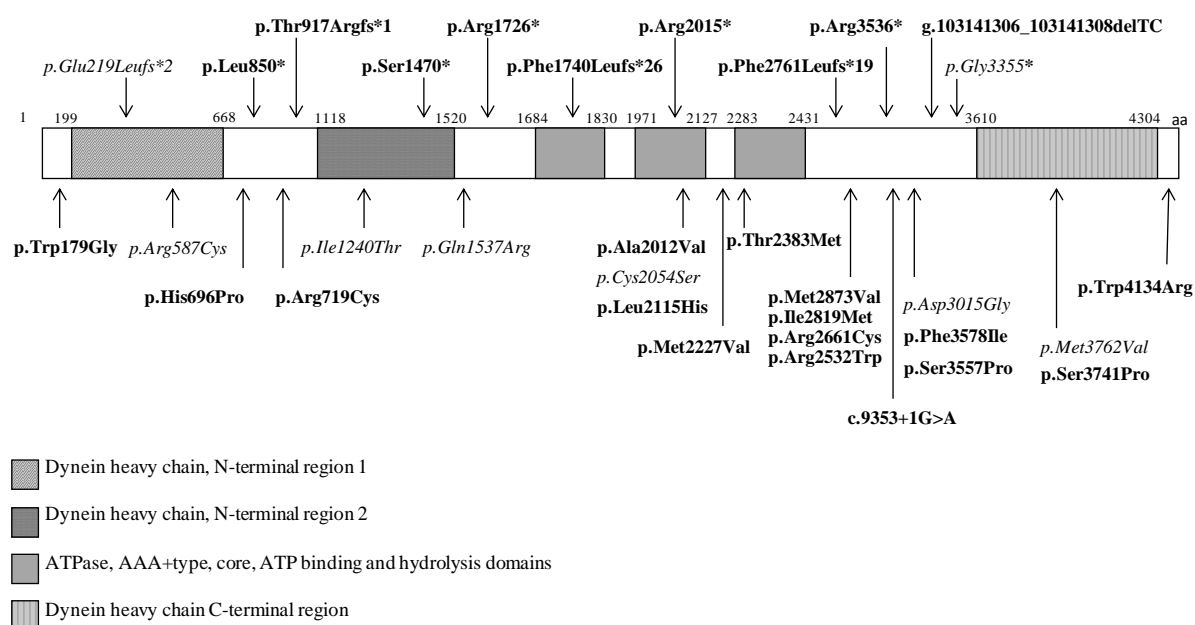
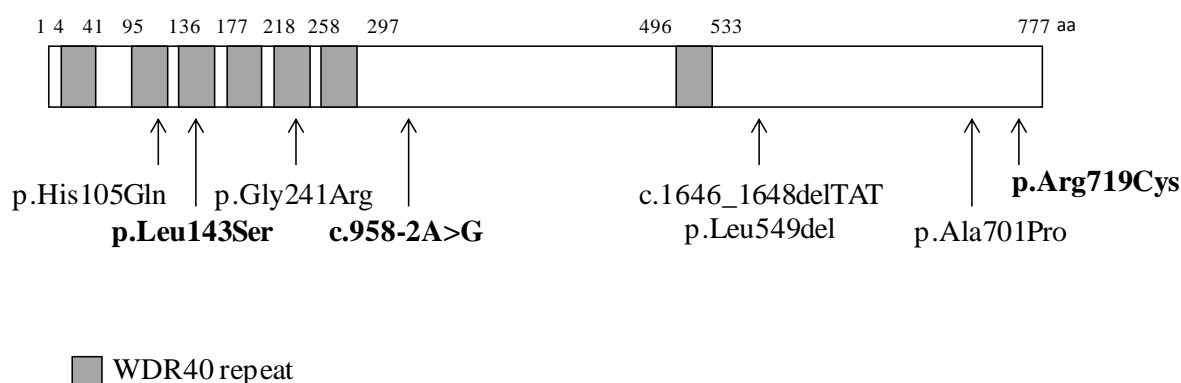


Figure 3. Location of *IFT80* mutations yet identified in ATD. In bold: mutations identified in the 2 ATD cases from the series. In non bold: mutations previously identified by Beales et al. and Cavalcanti et al.



Families fetus	CS	Family origin	ATD diagnosis before TP	Autopsy term (weeks)	Postaxial PD	Renal anomalies	Hepatic anomalies	Other features	Mutated gene	cDNA change	Amino-acid change	Location
F1.f1	No	France	-	23	+	-	-	-	DYNC2H1	c.5176C>T c.6679A>G	p.Arg1726* p.Met2227Val	Ex 34 Ex 42
F1.f2	No	France	+	18	-	-	portal fibrosis	-				
F1.f3	No	France	+	15	-	-	-	-				
F2.f1	No	France	+	24	-	-	-	-	DYNC2H1	c.5220delT c.10732T>A	p.Phe1740LeufsX26 p.Phe357Ile	Ex 34 Ex 72
F2.f2	No	France	+	17	-	hydronephrosis	portal fibrosis	-				
F2.f3	No	France	+	18	-	-	-	-				
F3	No	France	-	25	-	-	-	-	DYNC2H1	c.6161G>C c.9353+1G>A	p.Cys2054Ser /	Ex 39 Ex 59
F4	No	France	-	22	+	-	-	micropenis	DYNC2H1	c.2749_2750delCTinsG c.6444T>A	p.Thr917ArgfsX1 p.Leu2115His	Ex 19 Ex 39
F5.f1	No	France	-	28	-	-	-	-	DYNC2H1	c.654_655ins29bp c.9044A>G	p.Glu219LeufsX2 p.Asp3015Gly	Ex 5 Ex 57
F5.f2	No	France	+	24	-	-	-	-				
F6.f1	No	France	-	22	+	-	-	-	DYNC2H1	c.6035C>T C.124000T>C	p.Ala2012Val p.Trp4134Arg	Ex 38 Ex 86
F6.f2	No	France	+	14	+	-	-	-				
F6.f3	No	France	+	18	+	-	-	-				
F7.f1	No	France	+	35	-	-	-	-	DYNC2H1	c.9044A>G c.11221T>C	p.Asp3015Gly p.Ser3741Pro	Ex 57 Ex 77
F7.f2	No	France	+	26	-	-	-	-				
F8	No	Portugal	+	24	-	-	-	-	DYNC2H1	c.10606C>T c.2087A>C	p.Arg3536* p.His696Pro	Ex 70 Ex 14
F9	No	France	+	26	-	hydronephrosis	portal fibrosis	-	DYNC2H1	c.4610A>G/+	p.Gln1537Arg	Ex 30
F10	No same family than L13	France	-	24	-	1 renal cyst	-	-	DYNC2H1	c.9044A>G /+	p.Asp3015Gly	Ex 57
F11	No	France	+	28	+	-	-	-	IFT80	c.958-2A>G c.428C>T	/ p.Leu143Ser	In 9 Ex 5
F12	No	France	-	18	+	hydronephrosis	-	cleft palate; segmentation pulmonary anomalies	-	-	-	-
F13.f1	yes	Turkey	-	27	-	renal hypoplasia	-	situs inversus; cleft palate	-	-	-	-
F13.f2	yes	Turkey	+	15	-	renal cysts	bile duct agenesis	situs inversus	-	-	-	-
F14.f1	No	France	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-
F14.f2	No	France	+	35	-	-	-	-				
F15.f1	No same family than L19	France	+	23	-	hydronephrosis	portal fibrosis	-	-	-	-	-
F15.f2	No	France	+	20	-	renal cysts	portal fibrosis	-				
F16.f1	No	France	+	34	-	renal dysplasia	portal fibrosis	organomegaly				
F16.f2	No	France	+	25	-	renal cysts	portal enlargement	pancreas cyst	-	-	-	-
F17	No	Germany	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-
F18	No	France	-	37	-	-	-	-				

Table 1

Table2

Patient	Age	CS	Family origin	Respiratory neonatal distress	Long term respiratory complications	Postaxial PD	BD with cone shaped epiphysis	Renal features	Hepatic features	Retina involvement	Height	Other features	Mutated gene	cDNA change	Amino-acid change	Location
L1	25 years	No	France	+	-	-	-	-	-	-	1.78 m	-	<i>DYNC2H1</i>	c.8283delT c.8617A>G	p.Phe2761LeufsX19 p.Met2873Val	Ex 51 Ex 54
L2	7 years	No	France	+	+	-	-	-	-	-	+1.5 DS	-	<i>DYNC2H1</i>	c.2549T>A c.6679A>G	p.Leu850* p.Met2227Val	Ex 17 Ex 42
L3	6 months	No	France	-	-	-	-	-	-	not performed	M	-	<i>DYNC2H1</i>	c.6043C>T c.9044A>G	p.Arg2015* p.Asp3015Gly	Ex 38 Ex 57
L4	5 years	No	France	+	+	-	-	renal cysts	increased ?GT (4N)	yes (5 years)	-1 SD	-	<i>DYNC2H1</i>	c.7981C>T c.8457A>G	p.Arg2661Cys p.Ile2819Met	Ex 49 Ex 53
L5	2 years	No	France	-	+	-	-	-	-	yes (mild alteration at 2 years)	+2 SD	scoliosis microdontia	<i>DYNC2H1</i>	c.1759C>T c.7148C>T	p.Arg587Cys p.Thr2383Met	Ex 12 Ex 44
L6	16 years	No	France	+	-	-	-	-	-	-	1.62 m	-	<i>DYNC2H1</i>	c.535T>G c.6161G>C	p.Trp179Gly p.Cys2054Ser	Ex 4 Ex 39
L7	8 years	No	Poland	+	+	-	-	-	-	-	-1 SD	-	<i>DYNC2H1</i>	c.3719T>C c.10063G>T	p.Ile1240Thr p.Gly3355*	Ex 25 Ex 66
L8	16 months	Yes	Morocco	+	+	-	-	-	-	not performed	-0.5 SD	-	<i>DYNC2H1</i>	c.11284A>G/c.11284A>G	p.Met3762Val p.Met3762Val	Ex 78
L9	16 months	No	France	+	+	-	-	-	-	-	+1 SD	-	<i>DYNC2H1</i>	Del FISH probe RP11-2I22 c.10669T>C	/	Ex 71
L10	9 months	Yes	Turkey	-	+	+	-	-	-	not performed	-1 SD	situs inversus	<i>DYNC2H1</i>	c.7594C>T / c.7594C>T	p.Arg2532Trp/p.Arg2532Trp	Ex 47
L11	4 years	No	France	+	+	-	-	-	-	-	-1 SD	-	<i>DYNC2H1</i>	c.7078CG>T / +	p.Asp2360Tyr/+	Ex 43
L12	9 years	No	France	+	+	-	-	-	-	-	-2.5 SD	-	<i>DYNC2H1</i>	c.9044A>G/+	p.Asp3015Gly/+	Ex 57
L13	7 years	No same family than F10	France	-	-	-	+	-	increased ?GT (transient)	yes (7 years)	M	-	<i>DYNC2H1</i>	c.9044A>G / +	p.Asp3015Gly/+	Ex 57
L14	14 years	No	France	+	+	-	+	-	cholestasis and hepatic fibrosis	yes (14 years)	-1.5 SD	lumbar spine narrowness	<i>DYNC2H1</i>	c.3719T>C / +	p.Ile1240Thr/+	Ex 25
L15	36 years	No	France	-	+	-	-	-	-	-	1.50 m	abnormal pulmonary segmentation; hip epiphyseal dysplasia	<i>IFT80</i>	c.2155C>T / +	p.Arg719Cys/p.Arg719Cys	Ex 19
L16	16 months	No	France	-	-	-	-	-	-	not performed	-0.5 SD	-	-	-	-	-
L17	7 years	Yes	Algeria	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-
L18	24 years	No	France	-	-	-	+	cyst.renal transplantation at 20y	increased ?GT	yes (17years)	1.60 m	obesity; scoliosis; lumbar spine narrowness	-	-	-	-
L19	5 years	No, same family than F15	France	+	+	-	+	-	-	yes (5 years)	-6 SD	scoliosis and cervical spine stenosis	-	-	-	-
L20	9 years	No	Portugal	+	+	-	-	-	-	yes (9 years)	-4.5 SD	-	-	-	-	-
L21	10 years	Yes	Algeria	-	+	-	+	-	-	yes (8 years)	-4 SD	microdontia; obesity	-	-	-	-
L22	48 years	No	France	-	-	+	+	nephronophthisis.re nal transplantation at 30y	increased ?GT and steatosis	-	1.51 m	obesity; situs inversus; lumbar spine narrowness	-	-	-	-
L23	3 years	Yes	France	+	+	-	+	cysts and tubular dysfunction	-	-	-4 SD	-	-	-	-	-

Table 3: recommendations for ATD follow up

	Inclusion of	Start	Minimal frequency
Physical examination	<ul style="list-style-type: none"> - respiratory parameters - anthropometrics measurements (thoracic perimeter, standing and sitting height, weight, limbs segments) - neuromuscular evaluation (muscular testing) - arterial blood pressure - abdominal examination - back static examination 	at diagnosis	<ul style="list-style-type: none"> - every year until 15year - then on indication
pulmonary function testing	<ul style="list-style-type: none"> - polygraphic sleep study - spirometry and volumes measurements 	<ul style="list-style-type: none"> - 6 months - 5 years 	<ul style="list-style-type: none"> - systematic , per 1 or 2 years - if pulmonary involvement, per 2 year
renal tests	- urinary and blood tests (tubular	at diagnosis	- per year until 15 year

	and glomerular evaluation) - abdominal ultrasound		- then less frequently but at least per 3 years
liver evaluation	- liver function - abdominal ultrasound	at diagnosis	- per year until 15 year - then less frequently but at least per 3 years
pancreatic function	- pancreatic function - abdominal ultrasound	at diagnosis	
eyes evaluation	- electroretinogram	5 years	- every 2 -3 years
orthopaedics	- cervical spine MRI (magnetic resonance imaging) - Spine and hips X-rays	- 6 months or at diagnosis - 8-10 years	- systematic then on indication - on clinical indication
others	- genetics counseling and molecular analysis - psychological support	- at diagnosis -after diagnosis	Regularly

2. Etudes moléculaires des deux familles atteintes de la Dystrophie Thoracique de Jeune, non liées à *DYNC2H1* et *IFT80*

a. Famille N

i. Tour de génome sur puce Affymetrix 250K

Deux enfants atteints sur trois ont été testés sur puce (31C8 et 31C9). Le choix s'est fait sur la qualité et sur la quantité d'ADN disponible. L'analyse bioinformatique des résultats a permis de mettre en évidence trois régions d'homozygotie (figure 22) :

- ~ Une sur le chromosome 11p15.2-11p15.1 de 3,18Mb avec un lodscore de 3.15
- ~ Une sur le chromosome 14q31.3-14q32.11 de 3.18Mb avec un lodscore de 3.18
- ~ Une sur le chromosome 17q23.2-17q24.2 de 4.64Mb avec un lodscore de 3.15

Snp Selection: 86656snps

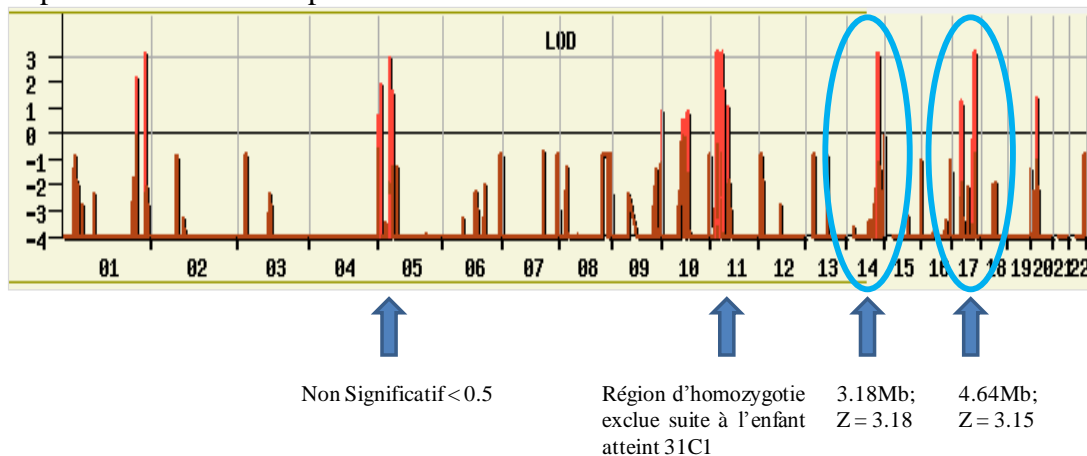


FIGURE 22 : RESULTATS DE L'ETUDE DE LIAISON DE GENOME ENTIER SUR PUCE AFFYMETRIX 250K DANS LA FAMILLE N L'analyse filtrée des résultats met en évidence trois régions significatives correspondant au Lodscore maximal atteint dans cette famille.

ii. Haplotype par marqueurs microsatellites

Afin de vérifier ces trois régions d'homozygotie chez les trois fœtus, nous avons utilisé :

- ~ 6 marqueurs au locus situés sur le chromosome 11 (D11S1348, D11S1307, D11S14170, D11S4193, D11S4121, D11S4099).
- ~ 6 marqueurs au locus situés sur le chromosome 14 (D14S67, D14S68, D14S1058, D14S256, D14S1044, D14S995)
- ~ 11 marqueurs au locus situés sur le chromosome 17 (D17S1811, VNTR-42AC intragénique, D17S1835, D17S794, D17S948, D17S944, D17S1809, D17S1874, D17S1816, D17S942, D17S807)

La région sur le chromosome 11 n'a pas été confirmée car le troisième cas, 31C1, porte des allèles différents de ses sœurs atteintes (31C8 et 31C9) (Figure 23).

Les marqueurs microsatellites testés pour la région sur le chromosome 14 sont semi-informatifs (homozygotes chez les enfants atteints et chez le père (Figure 24). Nous ne pouvons donc pas exclure cette région. La région sur le chromosome 14q31.3-14q32.11 fait 3.18Mb.

Enfin, la région d'homozygotie sur le chromosome 17 a été confirmée : les trois enfants atteints sont homozygotes et haplo-identiques pour l'ensemble des marqueurs de la région ayant hérité de l'allèle morbide de chacun de leurs parents (Figure 25). La région sur le chromosome 17q23.2-17q24.2 est de 4,64Mb.

iii. *Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 11*

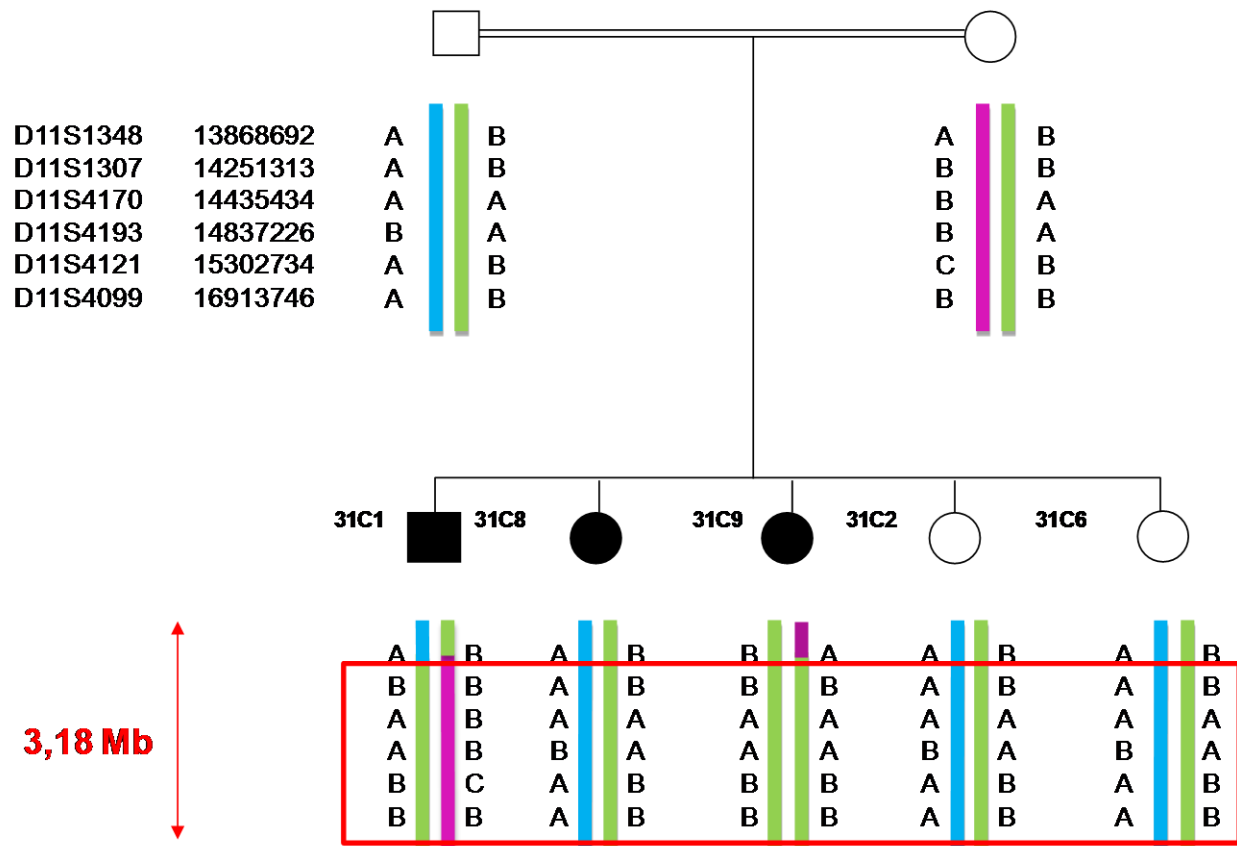


FIGURE 23 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 11 DE LA FAMILLE N La région d'homozygotie est exclue car les marqueurs microsatellites se trouvent à l'état homozygote pour le même allèle chez l'individu 31C8-C9 alors qu'ils se trouvent à l'état hétérozygote chez 31C1.

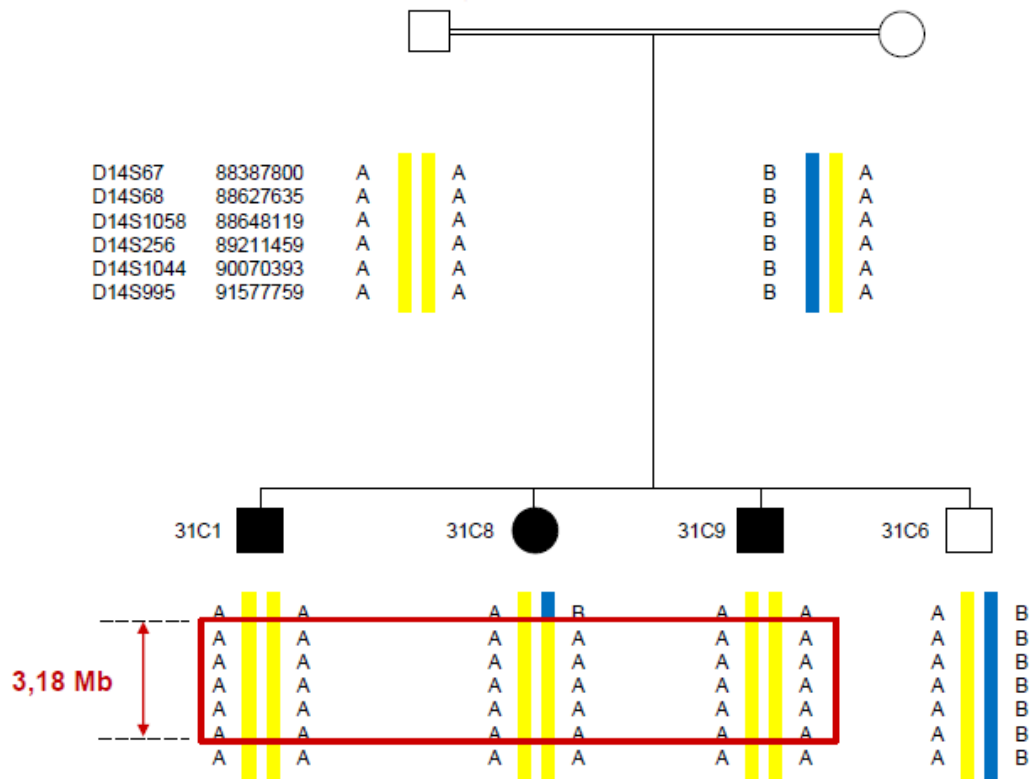
iv. *Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 14*

FIGURE 24 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION D'HOMOZYGOTIE MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 14 DE LA FAMILLE N Les marqueurs microsatellites sont semi-informatifs puisqu'ils sont homozygotes chez les trois enfants atteints et chez le père.

$$Z_{\max} = 3,18$$

v. Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 17

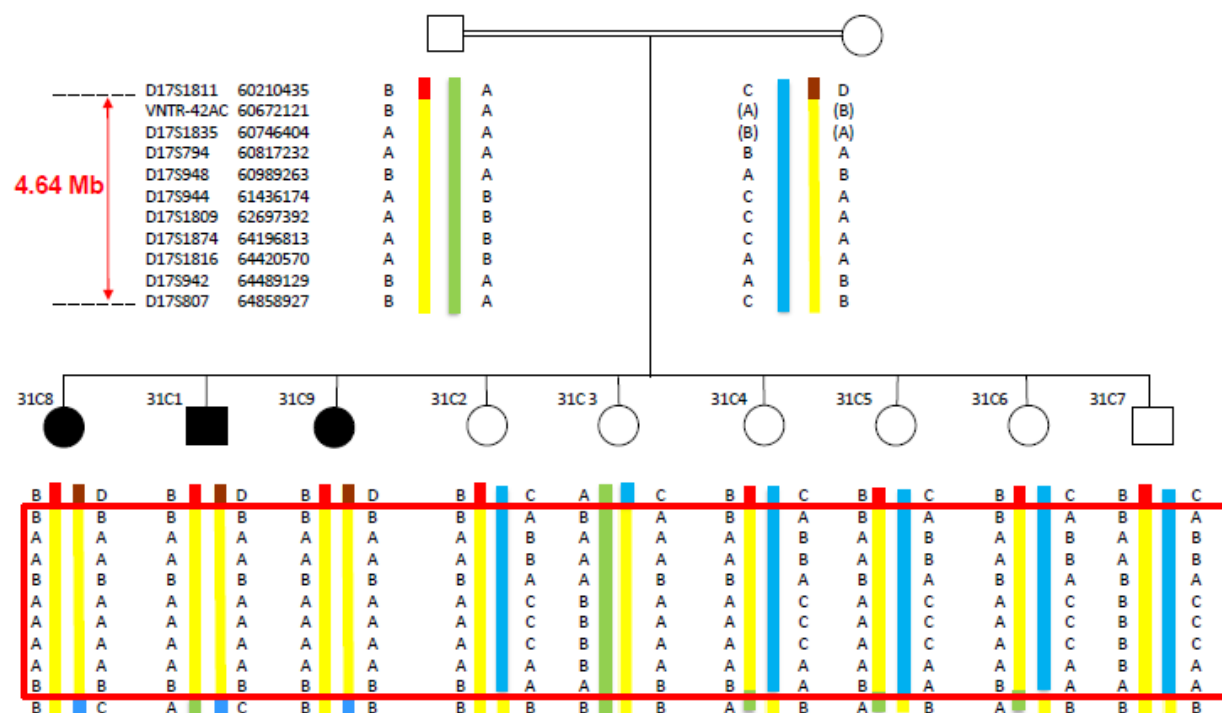


FIGURE 25 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 17 DANS LA FAMILLE N Les trois enfants atteints sont homozygotes et haplo-identiques. $Z_{max} = 3,18$

vi. Séquençage de gènes candidats dans la famille N

➤ Région d'homozygotie sur le chromosome 14q31.3-14q32.11

La région 14q comporte 40 gènes dont 11 gènes codant pour des protéines ciliaires d'après la base de données du cil (cildb) (Figure 26).

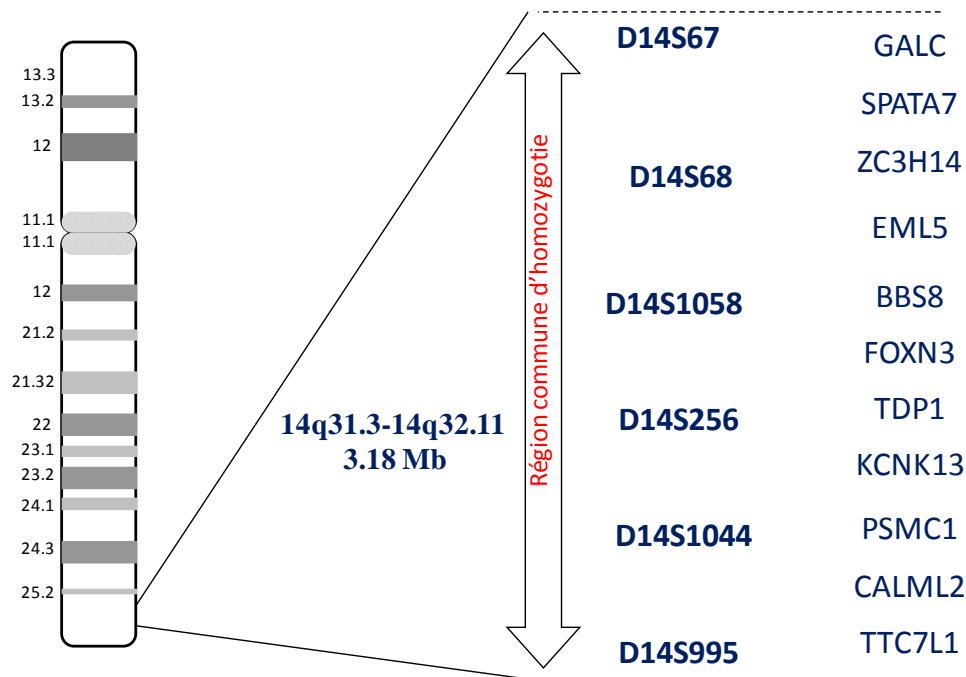


FIGURE 26 : GENES CANDIDATS PAR LEURS FONCTIONS ET LEURS LOCALISATIONS (CHROMOSOME 14)

Cette région d'homozygotie est composée de 11 gènes candidats codant pour des protéines ciliaires, répertoriés dans la base de données cildb (<http://cildb.cgm.cnrs-gif.fr>).

Cette région étant semi-informative, nous avons décidé de nous intéresser d'abord à la région du chromosome 17.

➤ *Région d'homozygotie sur le chromosome 17q23.2-17q24.2*

La région 17q comporte 71 gènes dont 19 gènes candidats répertoriés comme codants pour des protéines ciliaires d'après la base de données du cil (cildb). Tous ces gènes ont été exclus par séquençage direct (Figure 27). Il reste 52 gènes non répertoriés dans la base de données de cils.

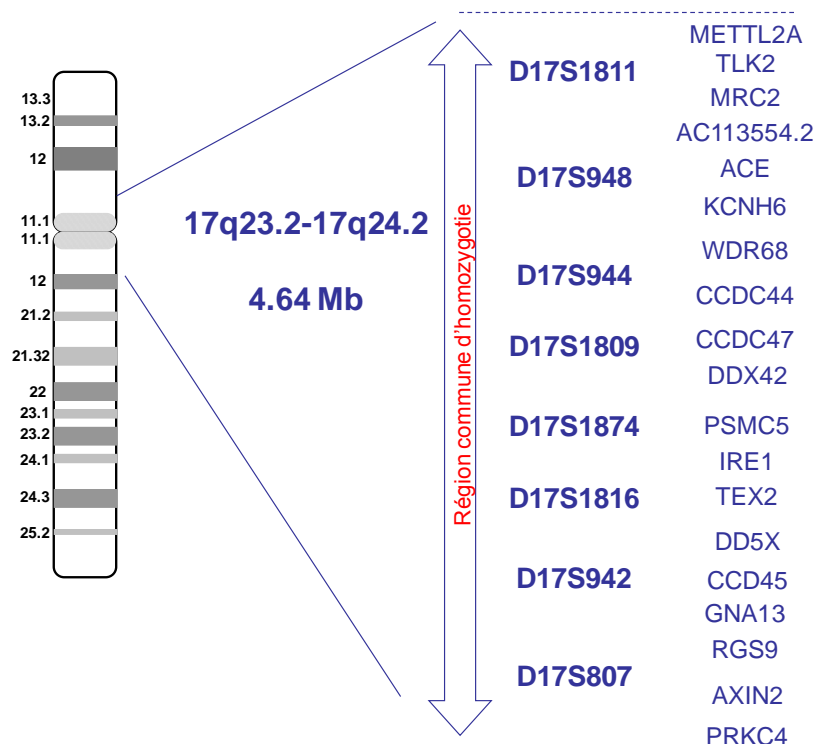


FIGURE 27 : GENES CANDIDATS PAR LEURS FONCTIONS ET LEURS LOCALISATIONS (CHROMOSOME 17)

Cette région d'homozygotie comprend 19 gènes candidats codant pour des protéines ciliaires, répertoriés dans la base de données cildb (<http://cildb.cgm.cnrs-gif.fr>) et exclus par séquençage direct.

Nous avons donc décidé d'adopter une stratégie de type exome ciliaire nous permettant d'étudier à la fois la région du chromosome 14 et la région du chromosome 17.

vii. Séquençage par exome ciliaire dans la famille N

Les résultats ont été analysés par le service de bioinformatique de la Fondation Imagine (cf. chapitre Matériels et Méthodes) (Figure 34). Le séquençage par exome ciliaire nous a permis d'obtenir sur l'ensemble du génome 25 gènes avec des variations homozygotes. De façon surprenante aucune variation n'est située dans mes régions d'homozygoties sur les chromosomes 14 et 17. Parmi ces variations homozygotes, il existe trois variations faux-sens, toutes « probably damaging » selon le programme de prédiction Alamut, 14 variations de types délétion et/ou insertion, six variations introniques dont une créant une altération de l'épissage de l'ARN messager et cinq qui pourraient avoir des conséquences au niveau de 3' UTR et, enfin, une variation référencée comme étant un polymorphisme fréquent dans la population (Table 2). **Ces variations ont été exclues par séquençage direct.** Nous avons décidé d'envoyer notre échantillon pour un séquençage d'exome entier afin d'élargir notre recherche de gènes.

Gènes du cils	Chromosomes	Changement nucléotidique	Proteine	Localisation	Type de Mutation
CLPTM1	19	c. 485 G>T	p. G162 V	exon 5	coding
DBR1	3	c.1162 G>C	p.E388G	8	coding
USP9Y	Y	c.3786 T>G	p.N1262K	26	coding
WDR35	2	c.11387 A>GCCCTCGGTGACC	p.T380X	10	insertion, frameshift
DYNC111	7	c.172 G>GTGAGTATAGTCT	p.E 58X	3	insertion, frameshift
RABGAP1L	1	c.105 T>TCCGTATTCTAG	p.N 35X	2	insertion, frameshift
COG2	1	c.831 A>CGCGCTGACGCAT	p.N 277X	8	insertion, frameshift
BICC1	10	c.1623 A>GAAGAGACCTAGA	p.T 541X	12	insertion, frameshift
RFWD3	16	c.651 C/TC	p.D 217X	3	insertion, frameshift
COPB2	3	ins 1795 A/CCTCGGTCTCAAA	p.M599X	15	insertion, frameshift
GIMAP6	7	ex 2+7 nucléotides T/ATCCTATGTCGTATG		2	insertion, UTR
DARS	2	exon 14- 110 nucléotides A/ATT	UTR	13-14	insertion, UTR
ALDH1L1	3	T/TCTTT exon 11 -5 nucléotides		11	insertion, splice
MDM1	12	exon 4 -62 nucléotides		4	insertion, conséquence sur 3' UTR
CDHR3	7	ins 663 A/AGA	p.E221X	5	insertion, non frameshift
KRT17	17	CT/-	p.L80X	1	deletion, non frameshift
TLR6	4	1352 del G/-	p.R451X	2	deletion, non frameshift
LRRC50	16	T/G exon 12+68 nucléotides	3' UTR	12	UTR
TAF1C	16	A/C	3' UTR	15	UTR
ANKHD1	5	T/A exon 30 +84 nucléotides		30-31	UTR
LRRC50	16	T/G exon 12+68 nucléotides	3' UTR	12	UTR
FAM40A	1	T/G exon 15+82 nucléotides		15-16	UTR
IFT52	20	exon 9 -6 nucléotides		9	spliceceite
NOMO2	16	rs9330 G/C	p.G1195R	31	polymorphisme répertorié
AC074391.1	2	G/C (position 730)		exon 4	non codant

TABLE 2 : LES VARIATIONS HOMOZYGOTES IDENTIFIEES PAR SEQUENÇAGE PAR EXOME CILIAIRE

viii. Séquençage par exome dans la famille N

Avec le séquençage par exome, sur la région du chromosome 17, nous n'avons aucune variation homozygote. Nous avons donc vérifié la couverture des 67 gènes présents dans la région. Il y a une absence complète de couverture pour 12/67 gènes et absence partielle de couverture pour 16/67, seulement 20/67 sont bien couverts. Tous les gènes insuffisamment couverts ont été exclus par séquençage direct.

Avec le séquençage par exome, sur la région du chromosome 14 nous n'avons aucune variation homozygote. La couverture des gènes sur le chromosome 14 est en cours d'analyse par la plateforme de bioinformatique.

b. Famille A

i. Tour de génome sur puce Affymetrix 250K

Deux enfants atteints sur trois ont été testés par tour de génome sur puce Affymetrix. L'analyse bioinformatique des résultats a permis la mise en évidence de deux régions d'homozygotie communes aux deux fœtus atteints (figure 28) :

- ~ Une sur le chromosome 3q29 de 4,3Mb avec un lodscore de 2,66
- ~ Une sur le chromosome 8p22-8p21.2 de 9,7Mb avec un lodscore de 2,66

Snp Selection: 81370 snps

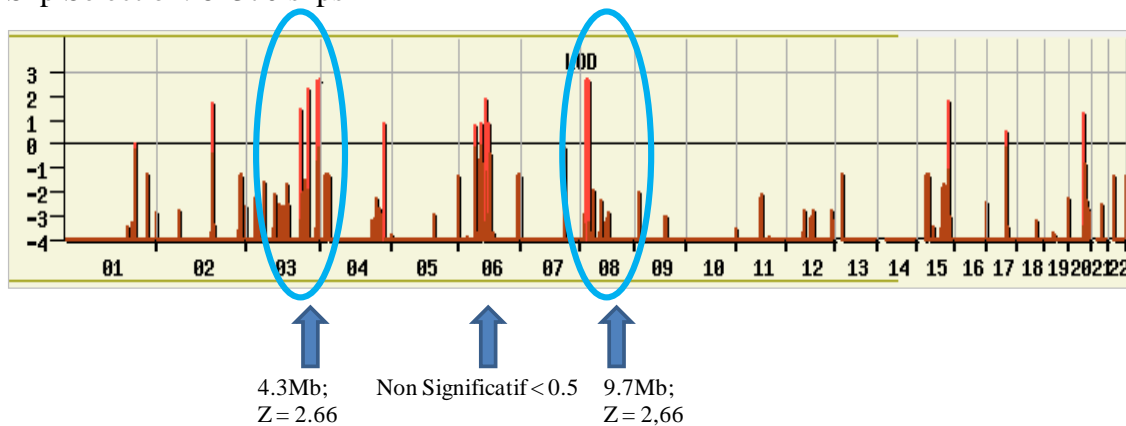


FIGURE 28 : RESULTATS DE L'ETUDE DE LIAISON DE GENOME ENTIER SUR PUCES AFFYMETRIX 250K DANS LA FAMILLE A L'analyse filtrée des résultats met en évidence deux régions significatives correspondant au Lodscore maximal atteint dans cette famille.

ii. Haplotype par marqueurs microsatellites

Afin de vérifier ces deux régions d'homozygotie chez les trois fœtus, nous avons utilisé :

- ~ 5 marqueurs au locus situés sur le chromosome 3 (D3S3590, D3S2748, D3S1265, D3S1311, D3S3550)
- ~ 17 marqueurs au locus situés sur le chromosome 8 (D8S552, D8S511, D8S1827, D8S1731, D8S549, D8S261, D8S1715, D8S258, D8S280, D8S282, D8S560, D8S298, D8S1786, D8S1733, D8S1752, D8S1734, D8S1739)

Les marqueurs microsatellites testés pour la région sur le chromosome 3 sont informatifs chez les trois enfants atteints : ils sont homozygotes et haplo-identiques pour l'ensemble des marqueurs de la région ayant hérité du même allèle morbide de chacun de leurs parents. Enfin, la région d'homozygotie sur le chromosome 8 a également été confirmée par cette méthode puisque les trois enfants atteints sont homozygotes et haplo-identiques pour l'ensemble des marqueurs de la région.

iii. Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 3

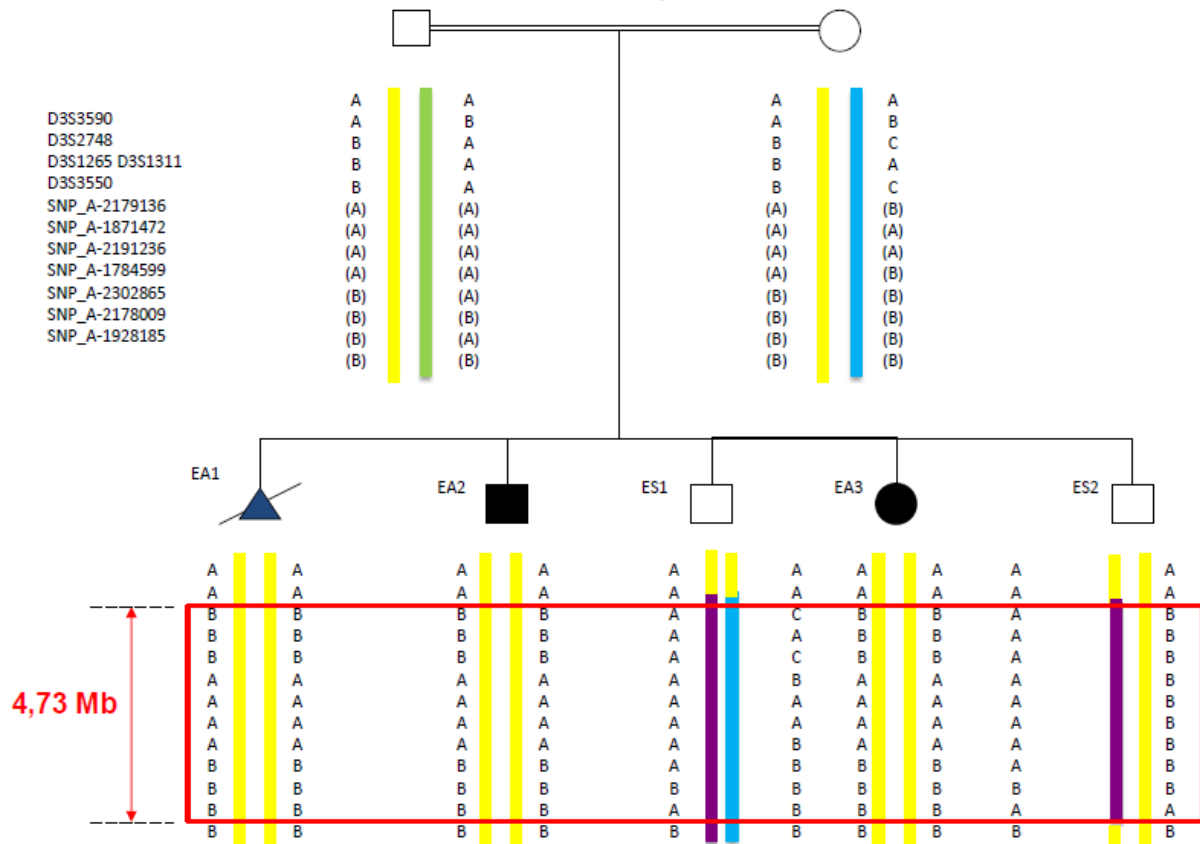


FIGURE 29 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION D’HOMOZYGOTIE MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 3 DE LA FAMILLE A

Les trois enfants atteints sont homozygotes et haplo-identiques (région 3q29, 4,73Mb). Cela confirme le résultat donné par la puce Affymetrix.

iv. Haplotype par marqueurs microsatellites sur le chromosome 8

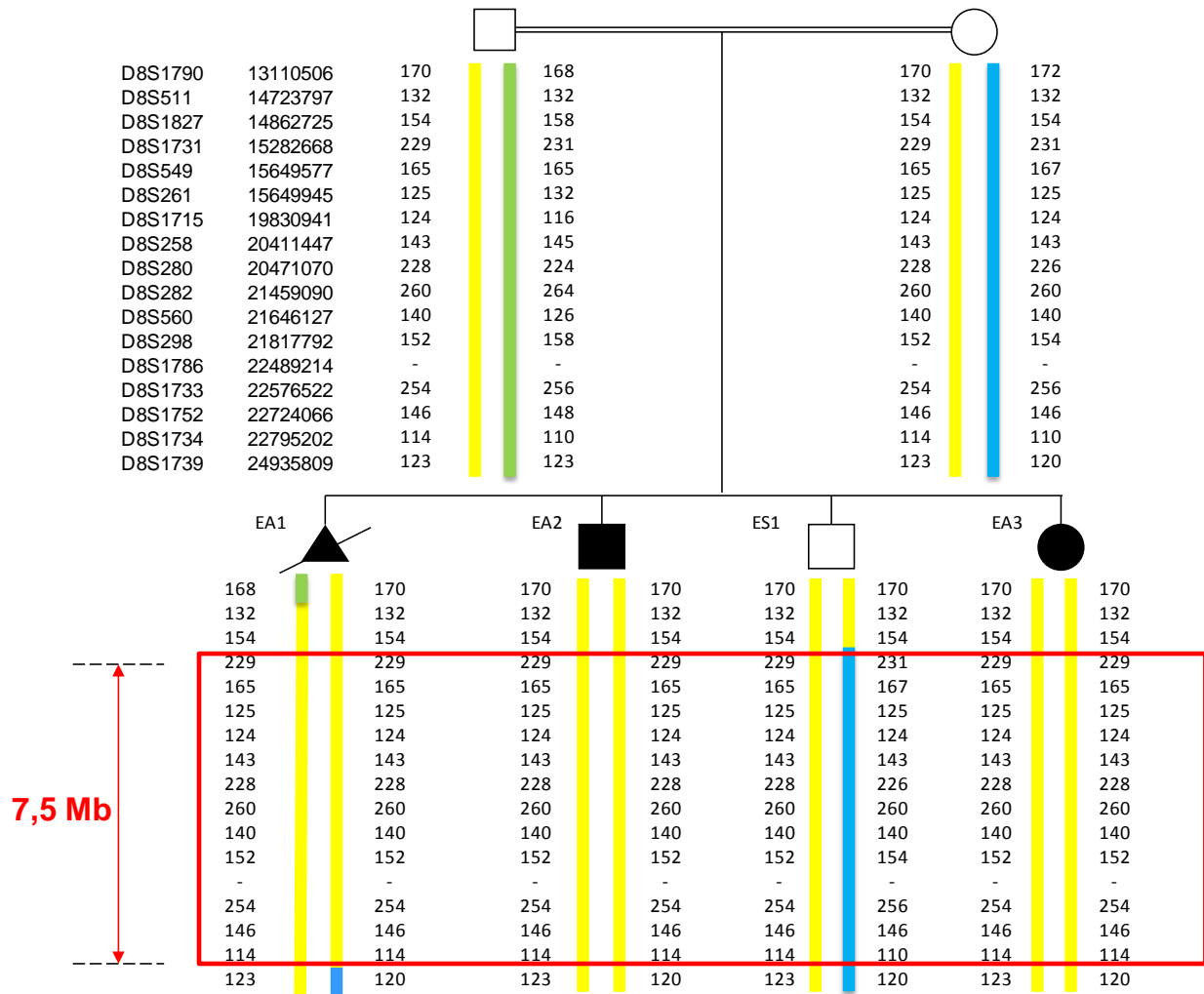


FIGURE 30 : CARTOGRAPHIE DE LA REGION D'HOMOZYGOTIE MISE EN EVIDENCE PAR TOUR DE GENOME SUR LE CHROMOSOME 8 DE LA FAMILLE A (8p22-8p21.2 ; 7,5Mb).

Les trois enfants atteints sont homozygotes et haplo-identiques. Cela confirme le résultat donné par la puce Affymetrix.

Nous nous sommes d'abord intéressées à la région d'homozygotie sur le chromosome 8 de 7,5Mb.

v. Séquençage de gènes candidats dans la famille A

➤ Région d'homozygotie sur le chromosome 8p22-8p21.2

La région 8p comporte 77 gènes dont 18 sont codants pour des protéines ciliaires répertoriés dans la base de cil. Parmi eux, 10 gènes ont été exclus par séquençage direct (Figure 32).

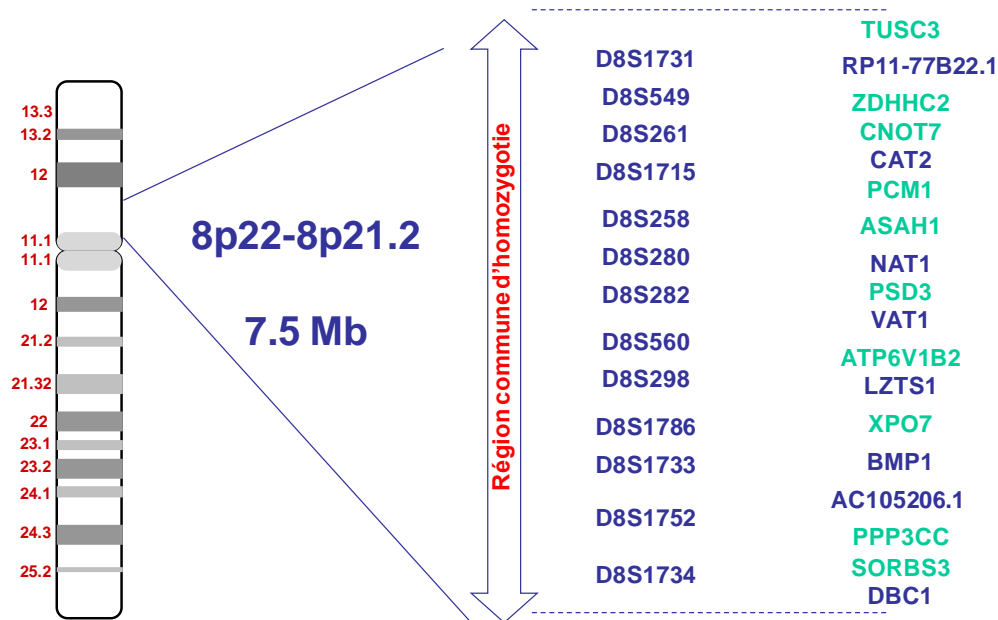


FIGURE 31 : GENES CANDIDATS PAR LEURS FONCTIONS ET LEURS LOCALISATIONS (CHROMOSOME 8).

Cette région d'homozygotie comporte 18 gènes candidats codants pour des protéines ciliaires répertoriés dans la base de données cildb (<http://cildb.cgm.cnrs-gif.fr>). **En vert les 10 gènes exclus par séquençage direct.**

➤ Région d'homozygotie sur le chromosome 3q29

La région 3q comporte 40 gènes dont 17 gènes répertoriés dans la base de données du cil.

Considérant le nombre de gènes présents dans les deux régions nous avons choisi une stratégie de type exome qui est en cours.

3. Bases moléculaires du syndrome de Majewski (CCP type II) / Beemer-Langer (CCP type IV)

(Article 2)

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le Journal of Medical Genetics dont je suis premier auteur et dont les principaux résultats sont les suivants :

Au sein d'une cohorte de 13 cas CCP de type II et sept cas CCP type IV, nous avons identifié des **mutations** homozygotes dans le gène *NEK1* dans trois familles consanguines et une famille non-consanguine CCP type II. Parmi ces mutations, nous avons identifié quatre mutations dont :

- ~ Deux mutations faux-sens (c.433G>A; p.Gly145Arg, c.758T>C; p.Leu253Ser)
- ~ Une délétion avec un décalage du cadre de lecture (c.2846_2847insGG 2847delT; p.Asp949Glufs*6)
- ~ Une mutation non-sens (c.379C>T; p.Arg127*).

Par ailleurs, nous avons identifié des mutations à l'état hétérozygote composite dans le gène *DYNC2H1* dans quatre familles non-consanguines. Parmi ces mutations, nous avons identifié neuf mutations dont :

- ~ Sept mutations faux-sens (c.1012A>G; p.Arg338Gly, c.1288C>T; p.Arg430Cys, c.4267C>T; p.Arg1423Cys, c.7985G>A; p.Arg2662Gln, c.7486C>T; p.Pro2496Ser, c.988C>T; p.Arg330Cys ; c.1483A>G; p.Lys495Arg). Une délétion avec un décalage du cadre de lecture (c.8534delA; p.Asn2845Ilefs*8)
- ~ Une mutation intronique qui crée un site d'épissage selon Alamut (c.12478-2A>G).

Dans une famille (famille 5), trois mutations faux-sens ont été identifiées dont deux héritées de la mère (c.1288C>T; p.Arg430Cys ; c.1012 A>G; p.Arg338Gly), bien sur le même allèle et une héritée du père (c.4267 C>T; p.Arg1423Cys).

Pour les deux gènes, toutes les mutations faux-sens n'ont pas été retrouvées chez 200 chromosomes contrôles, sont décrites comme damaging dans Alamut et sont responsables du changement d'acide aminé conservé au sein des espèces.

Pour une famille (famille 9), *NEK1* seulement a été exclu en raison d'une quantité insuffisante d'ADN et nous n'avons pas pu séquencer *DYNC2H1*.

Enfin, *NEK1* et *DYNC2H1* ont été exclus dans 2/11 familles CCP type II (18%) et dans toutes les familles CCP type IV.

Nous avons essayé d'établir des **corrélations** **génotype-phénotype** dans les groupes mutés *NEK1* et *DYNC2H1* versus non-mutés. Sur le plan des manifestations oro-faciales, nous avons observé des hamartomes linguaux et gingivaux chez 60 % des cas mutés dans *NEK1* et 25% des cas mutés dans *DYNC2H1*. Aucune des ces manifestations n'a été observée dans le groupe des non-mutés. En revanche nous avons observé une langue lobulée dans le groupe des non-mutés. Sur le plan viscéral, nous avons observé des kystes, une malrotation intestinale et des anomalies cardiaques dans les groupes mutés *NEK1* et *DYNC2H1*. Sur le plan cérébral, nous avons observé une holoprosencéphalie et une polymicrogyrie uniquement dans le groupe non-muté.

Pour les CCP type IV nous avons observé diverses caractéristiques cliniques telles que :

- ~ Agénésie du corps calleux
- ~ Hypoplasie cérébrale
- ~ Malrotation intestinale
- ~ Anomalies cardiaques

Nous avons comparé les manifestations cliniques de CCP type II et IV.

Sur le plan oro-facial, les manifestations cliniques qui apparaissent fréquemment sont l'hamartome lingual/gingival et une rétrognathie chez 45% des cas. Sur le plan génital, tous les fœtus mâles (60%) ont des anomalies uro-génitales telles qu'un micropénis.

D'autres manifestations sont observées telles que :

- ~ des anomalies rénales chez 50% des cas
- ~ des anomalies cérébrales chez 45% des cas
- ~ une malrotation intestinale chez 25% des cas
- ~ un méésentère commun chez 20% des cas
- ~ des anomalies cardiaques chez 25% des cas

V. DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES

C'est en 1976 que, pour la première fois, un lien entre un défaut du cil motile et une pathologie humaine, le syndrome de Kartagener, est établi (Afzelius, 1976). Au cours des 10 dernières années, le rôle du cil a largement été étudié à l'aide de modèles murins invalidés pour des protéines du cil mais également, par la mise en évidence chez l'homme, de mutations dans des gènes codants pour des protéines ciliaires dans diverses pathologies regroupées sous le terme de ciliopathies (Badano et al., 2006). Ce groupe comprend notamment les polykystoses rénales, les néphronophtises, le syndrome de Bardet-Biedl, le syndrome de Meckel, le syndrome de Joubert ou encore les syndromes Oro-Facio-Digitaux. Ces études ont montré que trois voies de signalisation majeures, la voie Hedgehog (Corbit et al., 2005; Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; Yan et al., 2004), la voie PDGF (Platelet-derived growth factor) (Christensen et al., 2007) et la voie Wnt (Ross et al., 2005; Simons et al., 2005) étaient impliquées dans l'extrême variabilité phénotypique observée dans le groupe des ciliopathies (Figure 33). La présence d'atteinte hépatique, rénale ou rétinienne et de malformations extrêmement diverses suggérait l'appartenance des CCP au groupe des ciliopathies. Ceci a été confirmé en 2007 par la mise en évidence de mutations dans *IFT80* chez des patients DTJ (Beales et al., 2007).

	PKD	NPHP	SLSN	EVC	JATD	OFD	ALMS	JS	BBS	MKS
Kystes rénaux	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Malformations du SNC				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dégénérescence rétinienne			✓		✓		✓	✓	✓	
Situs inversus		✓	✓		✓			✓	✓	✓
Polydactylie				✓	✓	✓		✓	✓	✓
Malformation des gonades				✓					✓	✓
Malformation cardiaques				✓			✓		✓	
Retard mental				✓	✓	✓		✓	✓	✓
Obésité							✓		✓	
Diabète							✓		✓	
Défauts squelettiques				✓	✓	✓				

FIGURE 32 : DIFFERENTS PHENOTYPES CILIAIRES ASSOCIES A PLUSIEURS EXEMPLES DE CILIOPATHIES

PKD: Polykystose rénale; NPHP: Néphronophtises ; SLSN: syndrome de Senior-Løken; EVC: Ellis van Creveld; JATD: Dystrophie Thoracique de Jeune; OFD: syndrome Orofaciodigital; ALMS: syndrome Alström; JS: syndrome de Joubert ;BBS: syndrome de Bardet-Biedl; MKS: syndrome Meckel-Gruber; SNC: Système nerveux central modifié selon [Iomini et al., 2009](#))

Mes travaux de thèse ont montré que le groupe des CCP partage avec l'ensemble des ciliopathies des caractéristiques communes comprenant la variabilité phénotypique d'un même spectre mutationnel, une extraordinaire hétérogénéité génétique pouvant conduire à des difficultés dans l'identification de nouveaux gènes. J'aborderai ces différents points au cours de ma discussion.

1. CCP et variabilité clinique d'un même spectre mutationnel : l'exemple du gène *DYNC2H1*

a. La DTJ

Au sein de notre cohorte de 39 familles nous avons montré que *DYNC2H1* est le gène majeur de la DTJ. En effet, nous avons identifié des mutations dans 59% des cas, avec une large majorité de mutations faux sens.

En 2009, l'identification de mutations dans *DYNC2H1* dans les CCP de type III et dans la DTJ avait suggéré que les CCP de type III et la DTJ faisaient partie d'un même spectre clinique allant de formes létales en anténatal à des formes compatibles avec la vie (Dagoneau et al., 2009). Les CCP de type III sont en effet caractérisées par une étroitesse thoracique majeure, une brièveté extrême des os longs avec des anomalies métaphysaires, une polydactylie post-axiale fréquente, et des malformations viscérales très diverses comprenant fente labio-palatine, malformations oro-faciales, génitales, cérébrales, rénales et cardiaques conduisant le plus souvent à des interruptions médicales de grossesses précoces (Ho et al., 2000). A l'inverse le diagnostic de la DTJ n'est parfois évoqué qu'à la naissance voire dans les premières années de vie et le suivi au long cours de la cohorte DTJ montre que le pronostic vital peut être favorable. La majorité des mutations identifiées dans *DYNC2H1* sont des mutations faux-sens (7/ 9 dans mes travaux, 7/10 mutations dans (Dagoneau et al., 2009); 3/5 mutations dans Merrill et al., 2009).

DYNC2H1 code pour une sous-unité du complexe dynéine cytoplasmique impliqué dans le transport intra-flagellaire rétrograde, la croissance et le maintien du cil et le recyclage des protéines ciliaires. Sur le plan fonctionnel, les mutations identifiées ont des conséquences directes sur la fonction de *DYNC2H1*. La mutation p.Asp3015Gly (identifiée dans la DTJ) perturbe la liaison hydrogène ainsi que la stabilité des 2 hélices α , ce qui induit un changement de structure 3D de la protéine et une altération de la fonction des microtubules (Dagoneau et al., 2009). La mutation p.Arg2205His (identifiée dans les CCP de type III) est localisée dans un

motif AAA et peut gêner l'hydrolyse de l'ATP et le mouvement microtubulaire (Merrill et al., 2009). De plus, deux autres mutations (p.Phe209Ile et p.Arg587Cys) altèrent le domaine N-terminal de *DYNC2H1*. Cela confirme que les mutations faux-sens affectent la fonction de *DYNC2H1*. Sur le plan histologique, l'étude des chondrocytes, issus de fémur de fœtus de patients DTJ ou CCP de type III, montre la même désorganisation de la plaque de croissance et une malformation identique du cil (Dagoneau et al., 2009; Merrill et al., 2009). A ce jour, aucune mutation non-sens à l'état homozygote n'a été identifiée que se soit chez les patients atteints de CCP de type III ou de la DTJ, suggérant que des mutations perte complète de fonctions sont associées à un phénotype encore plus sévère (Dagoneau et al., 2009; Merrill et al., 2009) et aucune corrélation génotype-phénotype n'a pu être établie.

b. Des mutations dans DYNC2H1 ont été identifiées dans les CCP de type II

Fait encore plus surprenant, nous avons identifié neuf mutations à l'état hétérozygote dans *DYNC2H1* chez 4/11 familles CCP de type II, entité distincte des CCP de type III et de la DTJ car caractérisée par une agénésie/ hypoplasie du tibia et une polysyndactylie jamais observée dans DTJ et CCP de type III. Les mutations sont là encore majoritairement des mutations de type faux-sens très proches de celles identifiées dans DTJ et CCP de type III sans qu'il soit possible d'établir de corrélation génotype-phénotype.

L'identification de mutations dans *DYNC2H1* dans la DTJ, et dans les CCP de type III et de type II ouvre un certain nombre de questions:

- l'extrême **variabilité phénotypique** d'un même spectre mutationnel illustre tout d'abord la limite des classifications nosologiques et plus particulièrement de la classification internationale des pathologies osseuses, basée sur la description clinique et radiologique (Warman et al., 2011). Celle ci distingue en effet 4 formes cliniques létales de CCP, et 2 formes compatibles avec la vie, la DTJ et l'EVC. Si cette classification est d'un intérêt indiscutable pour le clinicien, une classification moléculaire pourrait également être appliquée à l'ensemble des ciliopathies, toutes caractérisées par des spectres cliniques chevauchants (syndromes de Meckel, Bardet Biedl, Joubert...).

Aucune corrélation génotype-phénotype simple ne peut-être établie pour *DYNC2H1*. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer la variabilité clinique du spectre mutationnel de *DYNC2H1* allant de formes létales à des formes compatibles avec la vie, telles que l'oligogénicité, ou la notion de charge mutationnelle et de gène modificateur (Bredrup et al., 2011; Hildebrandt et al., 2011; Zaghoul and Katsanis, 2010). L'oligogénicité correspond à la présence de mutations hétérozygotes dans au moins deux gènes agissant ensemble pour induire le phénotype de la pathologie. Ce modèle est illustré par le syndrome de Bardet Biedl, qui a longtemps été considéré comme un modèle de triallélisme, avec l'observation de trois mutations dans deux (voire trois) gènes différents chez certains patients (Leitch et al., 2008). En effet, la présence de deux mutations ne semblait pas suffisante pour causer la maladie et la présence de deux mutations hétérozygotes en trans dans un des gènes *BBS* du complexe BBSome et d'une autre mutation hétérozygote dans un autre gène *BBS* semblait nécessaire pour causer la maladie. Une étude récente remet en question ce dogme en considérant finalement le syndrome Bardet Biedl comme une maladie autosomique récessive (Abu-Safieh et al., 2012). Un cas de digénisme avait été suggéré chez un patient de CCP de type II portant deux mutations hétérozygotes, l'une dans le gène *NEK1* et l'autre dans *DYNC2H1* (Thiel et al., 2011). Cependant, les limites du screening moléculaire (séquençage direct) et la possibilité de délétions ou mutations introniques ou dans des régions régulatrices non détectées dans l'un des deux gènes ne permettent pas d'affirmer ce mécanisme.

- Ceci nous conduit à introduire la notion de **charge mutationnelle** et de gène modificateur, qui correspond à la présence de deux mutations hétérozygotes composites ou homozygotes dans un gène majeur et de mutations hétérozygotes "simples" dans d'autres gènes codants pour des protéines ciliaires. Ces dernières joueraient le rôle de gène modificateur, expliquant la variabilité phénotypique associée au gène majeur. Des études récentes ont démontré l'effet additif de variant génétique sur le phénotype et celle de la charge globale mutationnelle sur la sévérité du phénotype. On peut ainsi citer la variabilité clinique observée dans le cadre des néphronophaties. Des patients présentant

une délétion homozygote dans *NPHP1*, responsable de la néphronophtise, et une mutation hétérozygote dans *NPHP6* ou *NPHP8*, ont des anomalies cliniques variables comprenant anomalies rétinienne ou cérébrales (Hildebrandt et al., 2011). Toujours dans le cadre des néphronophtises, on peut également citer les travaux récents sur *TTC21B*. Des mutations dans *TTC21B*, qui code pour IFT139, ont été identifiées dans des néphronophtises isolées ou dans des DTJ. Le séquençage de *TTC21B* dans une cohorte de ciliopathies extrêmement variées cliniquement montre la présence d'allèles pathogéniques (prouvées fonctionnellement) dans 5% des ciliopathies de cette cohorte démontrant ainsi qu'un même gène peut jouer à la fois le rôle de gène causal mais aussi interagir en trans avec d'autres gènes ciliaires jouant alors le rôle de gène modificateur. (Davis et al., 2011).

Une autre étude récente a montré que des mutations dans *DYNC2H1* sont responsables des dysplasies squelettiques avec une variabilité d'expression (Ocbina et al., 2011). Des souris mutantes homozygote pour *dync2h1^{ln/ln}* ont des fausses couches très précoces et les protéines Smo et Gli sont bloquées au niveau du sommet apical du cil. Chez des souris mutantes homozygotes *ift122^{sopb/sopb}*, *dync2h1* ne peut pas entrer dans le cil conduisant à une accumulation des particules IFT-B. Chez ces souris, la perte d'*ift122* n'affecte pas la protéine Gli alors que la protéine Smo est bloquée. Dans ce cas, le cil est court et boursoufflé dû à une accumulation des particules IFT-B et d'autres protéines ciliaires impliquées dans la voie de signalisation Hh. Les souris doubles mutantes *dync2h1^{ln/ln} ; ift122^{sopb/+}* présentent un phénotype normal avec une voie de signalisation Shh normal (les protéines Smo et Gli circulant normalement). *Ift122* et *Dync2h1*, sont nécessaires pour le transport intraflagellaire rétrograde, mais des mutations à l'état hétérozygote dans le gène *IFT122* supprime le phénotype induit par des mutations homozygotes dans *DYNC2H1*. Ces interactions génétiques illustrent le mécanisme cellulaire dans les ciliopathies et confirment que différentes mutations dans les gènes IFT (IFT-A ou B) peuvent être impliquées dans la variabilité phénotypique de la pathologie en raison de leurs rôles directs dans l'architecture du cil (Ocbina et al., 2011)

- Ce phénomène pourrait expliquer la **présence d'une seule mutation *DYNC2H1*** dans les 6 familles (26%) DTJ. A coté des limites de notre screening pouvant expliquer l'absence de détection de la seconde mutation, une autre hypothèse serait la présence d'un gène

majeur non identifié et un rôle pour *DYNC2H1* de gène modificateur. Cependant, la mise en évidence d'une délétion de l'exon 71 (g.103141306_103141308delTC) chez le père d'un patient DTJ, non détectée par séquençage direct, suggère aussi de compléter l'étude moléculaire de *DYNC2H1*, avant de conclure à l'implication d'un autre gène majeur chez ces patients DTJ. Pour cela, une puce ciblée sur *DYNC2H1* a été réalisée pour les 6 familles afin de chercher la présence d'une grande délétion dans ce gène. Après exclusion d'une délétion, un séquençage par exome sera envisagé chez ces patients.

2. L'hétérogénéité génétique

Mes travaux de thèse confirment l'extrême hétérogénéité génétique du groupe des CCP avec aucune mutation identifiée dans 15 familles DTJ, dans deux familles CCP de type II, et chez tous les patients CCP de type IV.

Nous avons en effet montré que :

- a. *DYNC2H1* est le gène majeur de la DTJ/ CCP de type III (59% des familles)
- b. *IFT80* est rarement impliqué dans la DTJ (5% des familles)
- c. Un sous groupe de DTJ avec épiphyses en cône et petite taille sans mutation dans *DYNC2H1* ou *IFT80* émerge de l'analyse clinique des patients DTJ. Ce sous groupe se rapproche du syndrome de Saldino- Mainzer (SSM), et une recherche de mutations dans *IFT140* par exome ciliaire est actuellement en cours. En effet, le syndrome de Saldino- Mainzer est caractérisé par des épiphyses en cônes, une maladie rénale chronique, une dystrophie rétinienne et une anomalie de la partie proximale du fémur. Perrault et al. ont récemment identifié des mutations dans *IFT140* dans 6/17 familles atteintes de SSM. Une seule mutation à l'état hétérozygote est identifiée dans 4/17 familles, 6/17 n'ont pas de mutation dans *IFT140* et enfin 1/17 famille est décrite comme présentant une étroitesse thoracique, un aspect du bassin en trident et des épiphyses en cônes ressemblant à une DTJ. L'atteinte rétinienne est présente de façon constante chez tous les patients. Elle est détectée dès la naissance chez 4/10 SSM et chez le patient atteint de la DTJ. En revanche, les anomalies rénales ne sont pas constantes chez les patients SSM. Elles peuvent apparaître dès l'âge de 9 mois. Des anomalies rénales chez le patient DTJ ont été détectées à l'âge de 18 mois. On ne peut exclure que certains patients considérés comme des DTJ développent une

atteinte rétinienne et rentrent alors dans le cadre diagnostique du SSM; de même la réalisation systématique de radiographie du bassin et du thorax chez les patients SSM serait importante pour mieux définir le spectre clinique des mutations *IFT140*. Les cellules RPE1 (Retinal Pigment Epithelial cell line) transfectées avec des mutations dans *IFT140* montrent qu'*IFT140* est localisé au niveau du corps basal et le cil présente un phénotype court et boursoufflé. Le transport rétrograde est donc altéré (Perrault et al., 2012).

- d. Dans deux familles de DTJ au moins, nous avons exclu les 9 gènes identifiés à ce jour (*EVC/EVC2*, *IFT80*, *NEK1*, *DYNC2H1*, *TTC21B*, *WDR35*, *WDR19*, *IFT140*).
- e. Dans le groupe des CCP de type II, nous avons identifié des mutations dans *NEK1* et *DYNC2H1* mais également exclu ces deux gènes dans deux familles avec holoprosencéphalie et polymicrogyrie. *DYNC2H1* et *NEK1* ont été exclus chez tous les CCP de type IV. Par ailleurs, dans les CCP de type II et IV sans base moléculaire identifiée, nous avons considéré comme gène candidat *TCTN3*, récemment impliqué dans le syndrome Mohr Majewski et partageant avec les CCP de Type II/IV une anomalie tibiale. En 1987, Silengo a décrit le syndrome de Mohr Majewski (MIM 252100) chez deux patients. Les 2 patients présentaient des caractéristiques typiques des OFD II (oro-facio-digital) ou syndrome de Mohr : langue lobulée, hypoplasie mandibulaire, mais également des anomalies du larynx, et une polysyndactylie postaxiale des pieds typiques du syndrome Majewski. (Silengo et al., 1978). Récemment, des mutations non-sens ont été identifiées dans *TCTN3* chez 6 fœtus et 2 patients "diagnostiqués" Mohr-Majewski (Thomas et al., 2012). Le phénotype de ces fœtus/patients se rapproche à la fois des CCP de type II et du syndrome de Meckel. Ils ont les caractéristiques cliniques et radiologiques suivantes : une dysmorphie faciale, une langue lobulée, une polydactylie au niveau des quatre membres, une dysplasie squelettique sévère avec une agénésie du tibia, des anomalies cérébrale avec un encéphalocèle occipital, une agénésie du corps calleux, des kystes rénaux (Thomas et al., 2012). *TCTN3* code pour une tectonine qui est impliquée dans la voie de signalisation Hh lors du développement du tube neural (Reiter and Skarnes, 2006). Des souris *tctn1*^{-/-} et *tctn2*^{-/-} ont un défaut au niveau du tube neuronal et une polydactylie. *TCTN1* et *TCTN2* régulent la voie de signalisation Shh et sont essentiels à la ciliogenèse mais pas au niveau de tous les tissus (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Reiter and Skarnes, 2006). *Tctn3* est colocalisée avec d'autres protéines ciliaires et forme un complexe au niveau de la zone de transition du cil. Dans des fibroblastes de

patients mutés *TCTN3*, la quantité de GLI3 est diminuée alors que GLI3R (la forme répressive) est augmentée cela suggère que le signal Shh est dérégulé suite à la répression de Gli3 (Thomas et al., 2012). Nous avons exclu *TCTN3* chez tous nos patients CCP de type II et IV.

- f. Si l'on considère les 11 gènes aujourd'hui identifiées dans les CCP et les spectres chevauchants (syndrome de Sensenbrenner et de Saldino-Mainzer) : *DYNC2H1* impliqué dans la DTJ, les CCP de type II et III (Dagoneau et al., 2009; El Hokayem et al., 2012; Merrill et al., 2009), *IFT80* dans la DTJ et les CCP de type III (Beales et al., 2007; Cavalcanti et al., 2011), *TTC21B* ou *IFT139* dans la DTJ (Davis et al., 2011), *WDR19* ou *IFT144* dans la DTJ (Bredrup et al., 2011), *IFT140* dans le syndrome de Saldino-Mainzer et la DTJ (Perrault et al., 2012), *NEK1* dans les CCP de type II (El Hokayem et al., 2012; Thiel et al., 2011), *WDR35* dans les CCP de type V, et le syndrome de Sensenbrenner (Bacino et al., 2012; Mill et al., 2011), *IFT122* et *IFT43* dans le syndrome de Sensenbrenner (Arts et al., 2011; Walczak-Sztulpa et al., 2010) et finalement, *EVC/EVC2* dans le syndrome d'Ellis Van Creveld (Baujat and Le Merrer, 2007; Galdzicka et al., 2002), ces protéines peuvent être regroupées selon leur fonction. Elles sont en effet impliquées soit dans le transport antérograde (complexe B) soit dans le transport rétrograde (complexe A) soit au niveau du corps basal.

Le complexe B, régulant le transport antérograde est composé de 14 protéines : IFT172, IFT88, IFT81, IFT80, IFT74, IFT70, IFT57, IFT54, IFT52, IFT46, IFT27, IFT25, IFT22 et IFT20 associé au moteur à kinésine II hétérotrimérique (KIF3A, KIF3B, KAP3). Parmi ces protéines, seule IFT80 a déjà été impliqué dans la DTJ et les CCP de type III (Beales et al., 2007; Cavalcanti et al., 2011).

Dans le groupe des kinésines, on peut citer KIF7 qui intervient dans la voie de signalisation Hh et qui est impliqué dans les syndromes hydroléthalus (MIN 236680) et acro-calleux (MIM 200990) (Putoux et al., 2011).

Le complexe A, régulant le transport rétrograde est composé de 6 protéines : IFT144, IFT140, IFT139, IFT122, IFT121, et IFT43 associé au moteur dynéine (*DYNC2H1* et *DYNC2L1*). Parmi ces protéines, IFT144 est impliqué dans le syndrome de Sensenbrenner et la DTJ, IFT140 est impliqué dans le syndrome de Saldino-Mainzer et la DTJ, IFT139 est impliqué dans la néphronophtise et la DTJ et *DYNC2H1* est impliqué dans la DTJ, et les CCP

de type II et III. Les autres IFT de ce complexe sont d'excellents candidats pour les CCP sans base moléculaire identifiée à ce jour.

Enfin, il existe trois protéines, impliquées à ce jour dans les CCP, localisées au niveau du corps basal : NEK1 impliqué dans les CCP de type II qui joue un rôle au cours de la mitose pour initier la formation du cil et EVC/EVC2 impliqués dans le syndrome d'Ellis Van Creveld qui joue un rôle dans la voie de signalisation Ihh.

Je n'ai pas pu au cours de ma thèse abordé l'analyse des cils dans les chondrocytes de nos patients mais ces études auraient pu nous orienter vers l'une ou l'autre des familles de protéines. En effet, la perturbation du moteur kinésine II ou IFT-B bloque la formation du cil. En revanche, la perturbation du moteur à dynéine ou IFT-A induit un phénotype de cil court et boursoufflé (Goetz and Anderson, 2010). Il a aussi été montré que chez *Chlamydomonas* que lorsqu'il y a une perte partielle de la fonction d'IFT-A, il y a aussi un défaut du transport rétrograde. En revanche, lorsqu'il y a une perte totale de la fonction d'IFT-A, le cil est alors absent (Iomini et al., 2009; Piperno et al., 1998).

Nous espérons que nos résultats d'exome nous permettront d'identifier de nouveaux gènes et de poursuivre ainsi par des études fonctionnelles et morphologiques des cils dans les chondrocytes.

3. Identification de nouveaux gènes et difficultés

L'avènement des nouvelles technologies, l'analyse de liaison pangénomique par puces Affymetrix 250K, la recherche de micro-remaniements par CGH array et plus récemment le séquençage haut débit d'exons a considérablement accéléré l'identification de nouveaux gènes. A ce jour, 326 exomes ont été rapportés avec de nouveaux gènes identifiés. En tout, 61 sur 108 gènes ont été identifiés dans des maladies autosomiques récessives (56,5%), 40 sur 108 gènes ont été identifiés dans des maladies autosomiques dominantes (37 %) et un gène responsable d'une maladie récessive ou dominante liée à l'X (Rabbani B. 2012). La plupart des variations pathogènes identifiées à ce jour sont situées dans des domaines très conservés. Parmi ces variations, 91,8% sont des variations faux-sens ou non-sens, 56% sont des petites insertions et/ou délétions, 24% mutations introniques créant un site d'épissage. En effet, 85% des mutations sont situées dans des exons (Rabbani B. 2012). Cette stratégie a conduit à l'identification de plusieurs gènes à l'origine des ciliopathies. Des mutations dans *TCTN3* (Thomas et al., 2012) et *IFT140* (Perrault et al., 2012) ont été identifiées grâce à l'exome ciliaire et des mutations dans *WDR35* (Bacino et al., 2012) et *WDR19* (Bredrup et al., 2011) grâce à l'exome.

Au cours de ma thèse, j'ai eu cependant à faire face aux difficultés inhérentes à ces nouvelles techniques et à leur interprétation. C'est ainsi qu'à ce jour, nous n'avons pas encore identifié de nouveaux gènes dans les familles N et A. Nous avons pour chaque famille identifié deux régions d'homozygotie de grande taille après étude par puce SNP. Nous avons alors opté pour une étude de l'exome ciliaire.

L'absence de mutation identifiée par la stratégie de type ciliome dans nos familles N et A nous a alors conduit à poursuivre par une stratégie de type exome.

Les difficultés de cette technique (également communes à l'exome ciliaire) sont :

A. Les limites techniques.

Au cours du séquençage par exome, une étape supplémentaire appelée « étape d'enrichissement ou de capture par hybridation en solution » est nécessaire afin d'augmenter le nombre de billes recouvertes d'ADN (cf. Matériels et Méthodes). Cette étape consiste à éliminer le plus possible de billes ne portant pas d'ADN. Avec les méthodes de capture par hybridation, la couverture des exons et la profondeur de lecture sur chaque exon n'est pas homogène comme nous l'avons évoqué précédemment. Cette étape présente divers inconvénients qui sont les suivants :

- ~ les sondes de capture ne peuvent pas être choisies dans des régions répétées (sinon hybridation aspécifique). Pour éviter cela, le design est fait avec un « Repeat Masker ». Il arrive que certains « repeats » se trouvent à proximité des exons voire dans les exons eux-mêmes, cela induira au final des exons qui seront couverts de façon incomplète ou pas couverts du tout. La détection des variations sera plus difficile dans les exons peu couverts. Il a été estimé qu'une profondeur de lecture de 15X est nécessaire pour pouvoir détecter une variation hétérozygote.
- ~ la capture est moins efficace pour les exons riches en GC.
- ~ l'efficacité de l'hybridation n'est pas homogène pour toutes les sondes
- ~ l'impossibilité de différencier les régions communes aux gènes et pseudo-gènes

B. Limites liées à l'analyse

- ~ **Les différents filtres de l'exome.** En effet, l'analyse bioinformatique de l'exome contient 40 000 variations. 90% de ces variations sont retrouvées dans différentes bases de données telles que dbSNP, 1000 Genomes Project, in-house database et Exome Variation Sequence ([Robinson et al., 2011](#)). Certaines variations, communes dans la population et non causale

des maladies Mendéliennes, sont de ce fait filtrées. Comme nous sommes dans le cas des maladies autosomiques récessives, nous sélectionnons soit les variations homozygotes dans le cas d'une famille consanguine soit les variations hétérozygotes composites dans le cas d'une famille non-consanguine. Lors de l'analyse des résultats de l'exome, nous pouvons avoir des variations faux-positives. Elles peuvent également être dues à une faible efficacité de capture ou un taux de couverture très faible (Rabbani B. 2011). Les critères de filtres utilisés par les bio-informaticiens peuvent influencer l'analyse des résultats en allant d'un mésappariement des séquences obtenues par rapport à la séquence de référence à la détection de la variation causale (Chee-Seng Ku et al. 2001). Cela peut donc augmenter les variations faux-positives et donc biaiser la recherche de gène (Rabbani B. 2011). Il faut noter que le taux de calcul algorithmique fait par la plateforme bioinformatique lors de l'analyse est élevé (environ 20% d'obtention de variation faux-positifs) (Mathe et al., 2006; Wei et al., 2010). Il serait plus judicieux de regrouper plusieurs individus pour augmenter nos chances d'identifier le gène causal de la pathologie. En effet, avec un seul individu les chances d'identifier le gène causal de la pathologie est très faible. Plus on groupe des individus d'une même famille ou présentant le même spectre de pathologie, plus on augmente les chances d'avoir des variations causales communes et donc d'identifier le gène responsable du phénotype (Robinson et al., 2011).

~ **Le taux de couverture des gènes.** Pour l'exome ciliaire, nous avons observé que la couverture de *DYNC2H1* est sous représenté d'un individu à l'autre. Par exemple, pour une famille de CCP type II, *DYNC2H1* avait un taux de couverture particulièrement faible chez un individu originaire du Brésil. Il a fallu compléter l'exome par un séquençage direct des exons suivants : 8, 9, 13, 31, 53, 56, 60, 64, 68, 71, 72, 73, 81, 88, 90 afin d'exclure le gène. De plus, pour les familles A et N séquençés par exome, nous avons observé un défaut de couverture d'un grand nombre de gènes. Pour la famille N, dans la région d'homozygotie 17q23.2-17q24.2. qui

comprend 67 gènes, il y a une absence complète de couverture pour 12/67 gènes et absence partielle de couverture pour 16/67 et seulement 20/67 sont bien couverts. Tous les gènes insuffisamment couverts ont été exclus par séquençage direct dans la région sur le chromosome 17. L'analyse du taux de couverture de la seconde région d' homozygotie sur le chromosome 14 est actuellement en cours et nous poursuivrons par un séquençage direct des exons non couverts. De même pour la famille A, le taux de couverture pour les deux régions (chromosomes 3 et 8) est actuellement en cours. Il faut noter que nous pouvons avoir des variations dans des régions non-codantes telles que les régions introniques ou des régions régulatrices ou des grandes délétions que l'exome ne détecterait pas.

En conclusion, nous avons rapporté que *DYNC2H1* est le gène majeur de la DTJ (59% des familles DTJ). Nous avons également identifié des mutations dans *DYNC2H1* dans les CCP de type II; ces résultats illustrent de l'extrême variabilité phénotypique du spectre mutationnel de *DYNC2H1* impliqué à ce jour dans la DTJ, les CCP de type II-III, sans corrélation génotype-phénotype simple.

Cette variabilité phénotypique pourrait s'expliquer par le phénomène de "charge" mutationnelle avec l'accumulation de variants génétiques dans des gènes codants pour des protéines ciliaires et jouant le rôle de gène "modificateur".

Nous avons 6 familles DTJ avec une seule mutation dans *DYNC2H1* suggérant soit une limite de notre séquençage direct soit l'implication d'autres gènes majeurs avec un rôle pour *DYNC2H1* de gène modificateur. Une stratégie de puce ciblée est en cours pour rechercher les grandes délétions dans *DYNC2H1*.

Le groupe des CCP est également caractérisé par une grande hétérogénéité génétique avec aucune mutation identifiée dans 15 familles DTJ, dans deux familles CCP de type II, et chez tous les patients CCP de type IV.

Pour au moins deux familles DTJ nous avons exclus les 9 gènes connus à ce jour. Compte tenu de la grande variabilité clinique observée pour un même gène et du nombre de gènes impliqués dans ce groupe de pathologies, l'utilisation du séquençage par exome couplée à la stratégie de cartographie par homozygotie nous permettra d'identifier de nouveaux gènes codants pour des protéines ciliaires et d'avancer dans la compréhension de la biogenèse ciliaire.

Outre la mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans ce groupe de chondrodysplasies sévères, nous souhaiterons également étudier l'effet additif de variant génétique et le phénomène de charge mutationnelle en estimant la contribution relative des variants identifiés par l'exome sur les éléments du phénotype (atteinte rénale, cérébrale, polydactylie, cardiopathie...) ou de celle de la charge globale mutationnelle sur la sévérité du phénotype.

Enfin, pour répondre au diagnostic prénatal, le séquençage par exome ciliaire sera un outil précieux et moins coûteux qu'un diagnostic moléculaire de routine par séquençage direct, afin d'identifier des mutations dans des gènes déjà connus.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Absalon, S., Blisnick, T., Bonhivers, M., Kohl, L., Cayet, N., Toutirais, G., Buisson, J., Robinson, D., and Bastin, P. (2008). Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 121, 3704-3716.
- Abu-Safieh, L., Al-Anazi, S., Al-Abdi, L., Hashem, M., Alkuraya, H., Alamr, M., Sirelkhatim, M.O., Al-Hassnan, Z., Alkuraya, B., Mohamed, J.Y., *et al.* (2012). In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 20, 420-427.
- Afzelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193, 317-319.
- Allen, A.W., Jr., Moon, J.B., Hovland, K.R., and Minckler, D.S. (1979). Ocular findings in thoracic-pelvic-phalangeal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 97, 489-492.
- Amar, M.J., Sutphen, R., and Kousseff, B.G. (1997). Expanded phenotype of cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome). *Am J Med Genet* 70, 349-352.
- Arts, H.H., Bongers, E.M., Mans, D.A., van Beersum, S.E., Oud, M.M., Bolat, E., Spruijt, L., Cornelissen, E.A., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., de Leeuw, N., *et al.* (2011). C14ORF179 encoding IFT43 is mutated in Sensenbrenner syndrome. *J Med Genet* 48, 390-395.
- Ashe, A., Butterfield, N.C., Town, L., Courtney, A.D., Cooper, A.N., Ferguson, C., Barry, R., Olsson, F., Liem, K.F., Jr., Parton, R.G., *et al.* (2012). Mutations in mouse *Ift144* model the craniofacial, limb and rib defects in skeletal ciliopathies. *Hum Mol Genet* 21, 1808-1823.
- Aughsteen, A.A. (2001). The ultrastructure of primary cilia in the endocrine and excretory duct cells of the pancreas of mice and rats. *Eur J Morphol* 39, 277-283.
- Bacino, C.A., Dhar, S.U., Brunetti-Pierri, N., Lee, B., and Bonnen, P.E. (2012). WDR35 mutation in siblings with Sensenbrenner syndrome: A ciliopathy with variable phenotype. *Am J Med Genet A*.
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., and Katsanis, N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 125-148.
- Baker, M.A., Hetherington, L., Reeves, G., Muller, J., and Aitken, R.J. (2008). The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 8, 2312-2321.
- Bard, L.A., Bard, P.A., Owens, G.W., and Hall, B.D. (1978). Retinal involvement in thoracic-pelvic-phalangeal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 96, 278-281.
- Baujat, G., and Le Merrer, M. (2007). Ellis-van Creveld syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2, 27.
- Beales, P.L., Bland, E., Tobin, J.L., Bacchelli, C., Tuysuz, B., Hill, J., Rix, S., Pearson, C.G., Kai, M., Hartley, J., *et al.* (2007). IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nat Genet* 39, 727-729.
- Beemer, F.A., Langer, L.O., Jr., Klep-de Pater, J.M., Hemmes, A.M., Bylsma, J.B., Pauli, R.M., Myers, T.L., and Haws, C.C., 3rd (1983). A new short rib syndrome: report of two cases. *Am J Med Genet* 14, 115-123.
- Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2006). The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development* 133, 4131-4143.
- Blacque, O.E., Perens, E.A., Boroevich, K.A., Inglis, P.N., Li, C., Warner, A., Khattra, J., Holt, R.A., Ou, G., Mah, A.K., *et al.* (2005). Functional genomics of the cilium, a sensory organelle. *Curr Biol* 15, 935-941.
- Blair, H.J., Tompson, S., Liu, Y.N., Campbell, J., MacArthur, K., Ponting, C.P., Ruiz-Perez, V.L., and Goodship, J.A. (2011). *Evc2* is a positive modulator of Hedgehog signalling that interacts with *Evc* at the cilia membrane and is also found in the nucleus. *BMC Biol* 9, 14.
- Bredrup, C., Saunier, S., Oud, M.M., Fiskerstrand, T., Hoischen, A., Brackman, D., Leh, S.M., Midtbo, M., Filhol, E., Bole-Feyssot, C., *et al.* (2011). Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19. *Am J Hum Genet* 89, 634-643.
- Cathcart, R.S., 3rd, and Worthington, W.C., Jr. (1964). Ciliary Movement in the Rat Cerebral Ventricles: Clearing Action and Directions of Currents. *J Neuropathol Exp Neurol* 23, 609-618.

Cavalcanti, D.P., Huber, C., Sang, K.H., Baujat, G., Collins, F., Delezoide, A.L., Dagoneau, N., Le Merrer, M., Martinovic, J., Mello, M.F., *et al.* (2011). Mutation in IFT80 in a fetus with the phenotype of Verma-Naumoff provides molecular evidence for Jeune-Verma-Naumoff dysplasia spectrum. *J Med Genet* 48, 88-92.

Chen, C.P., Su, Y.N., Hsu, C.Y., Chern, S.R., Tsai, F.J., Wu, P.C., Chen, P.T., and Wang, W. (2010). Ellis-van Creveld syndrome: prenatal diagnosis, molecular analysis and genetic counseling. *Taiwan J Obstet Gynecol* 49, 481-486.

Christensen, S.T., Pedersen, L.B., Schneider, L., and Satir, P. (2007). Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic* 8, 97-109.

Cideciyan, D., Rodriguez, M.M., Haun, R.L., Abdenour, G.E., and Bruce, J.H. (1993). New findings in short rib syndrome. *Am J Med Genet* 46, 255-259.

Cole, D.G. (2003). The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* 4, 435-442.

Cole, D.G., and Snell, W.J. (2009). SnapShot: Intraflagellar transport. *Cell* 137, 784-784 e781.

Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018-1021.

Dagoneau, N., Goulet, M., Genevieve, D., Sznajer, Y., Martinovic, J., Smithson, S., Huber, C., Baujat, G., Flori, E., Tecco, L., *et al.* (2009). DYNC2H1 mutations cause asphyxiating thoracic dystrophy and short rib-polydactyly syndrome, type III. *Am J Hum Genet* 84, 706-711.

Davis, E.E., Zhang, Q., Liu, Q., Diplas, B.H., Davey, L.M., Hartley, J., Stoetzel, C., Szymanska, K., Ramaswami, G., Logan, C.V., *et al.* (2011). TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat Genet* 43, 189-196.

de Vries, J., Yntema, J.L., van Die, C.E., Crama, N., Cornelissen, E.A., and Hamel, B.C. (2010). Jeune syndrome: description of 13 cases and a proposal for follow-up protocol. *Eur J Pediatr* 169, 77-88.

El Hokayem, J., Huber, C., Couve, A., Aziza, J., Baujat, G., Bouvier, R., Cavalcanti, D.P., Collins, F.A., Cordier, M.P., Delezoide, A.L., *et al.* (2012). NEK1 and DYNC2H1 are both involved in short rib polydactyly Majewski type but not in Beemer Langer cases. *J Med Genet* 49, 227-233.

Elcioglu, N.H., and Hall, C.M. (2002). Diagnostic dilemmas in the short rib-polydactyly syndrome group. *Am J Med Genet* 111, 392-400.

Ellis, R.W., and van Creveld, S. (1940). A Syndrome Characterized by Ectodermal Dysplasia, Polydactyly, Chondro-Dysplasia and Congenital Morbus Cordis: Report of Three Cases. *Arch Dis Child* 15, 65-84.

Galdzicka, M., Patnala, S., Hirshman, M.G., Cai, J.F., Nitowsky, H., Egeland, J.A., and Ginns, E.I. (2002). A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. *Mol Genet Metab* 77, 291-295.

Garcia-Gonzalo, F.R., Corbit, K.C., Sirerol-Piquer, M.S., Ramaswami, G., Otto, E.A., Noriega, T.R., Seol, A.D., Robinson, J.F., Bennett, C.L., Josifova, D.J., *et al.* (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet* 43, 776-784.

Gilissen, C., Arts, H.H., Hoischen, A., Spruijt, L., Mans, D.A., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., van Reeuwijk, J., Kant, S.G., *et al.* (2010). Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sensenbrenner syndrome. *Am J Hum Genet* 87, 418-423.

Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., *et al.* (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 27, 182-189.

Goetz, S.C., and Anderson, K.V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11, 331-344.

Handel, M., Schulz, S., Stanarius, A., Schreff, M., Erdtmann-Vourliotis, M., Schmidt, H., Wolf, G., and Holtt, V. (1999). Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* 89, 909-926.

Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., and Yoder, B.K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* 1, e53.

Haycraft, C.J., Zhang, Q., Song, B., Jackson, W.S., Detloff, P.J., Serra, R., and Yoder, B.K. (2007). Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation. *Development* 134, 307-316.

Hennekam, R.C. (1991). Short rib syndrome--Beemer type in sibs. *Am J Med Genet* 40, 230-233.

Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N Engl J Med* 364, 1533-1543.

Hilton, L.K., White, M.C., and Quarmby, L.M. (2009). The NIMA-related kinase NEK1 cycles through the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 52-56.

Ho, N.C., Francomano, C.A., and van Allen, M. (2000). Jeune asphyxiating thoracic dystrophy and short-rib polydactyly type III (Verma-Naumoff) are variants of the same disorder. *Am J Med Genet* 90, 310-314.

Huangfu, D., and Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11325-11330.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83-87.

Hudak, L.M., Lunt, S., Chang, C.H., Winkler, E., Flammer, H., Lindsey, M., and Perkins, B.D. (2010). The intraflagellar transport protein ift80 is essential for photoreceptor survival in a zebrafish model of jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 3792-3799.

Hui, C.C., Slusarski, D., Platt, K.A., Holmgren, R., and Joyner, A.L. (1994). Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol* 162, 402-413.

Iomini, C., Li, L., Esparza, J.M., and Dutcher, S.K. (2009). Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 183, 885-896.

Ishikawa, H., and Marshall, W.F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 222-234.

Janaswami, P.M., Birkenmeier, E.H., Cook, S.A., Rowe, L.B., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1997). Identification and genetic mapping of a new polycystic kidney disease on mouse chromosome 8. *Genomics* 40, 101-107.

Jensen, C.G., Poole, C.A., McGlashan, S.R., Marko, M., Issa, Z.I., Vujcich, K.V., and Bowser, S.S. (2004). Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biol Int* 28, 101-110.

Jeune, M., Beraud, C., and Carron, R. (1955). [Asphyxiating thoracic dystrophy with familial characteristics]. *Arch Fr Pediatr* 12, 886-891.

Karp, S.J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., and McMahon, A.P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* 127, 543-548.

Keppler-Noreuil, K.M., Adam, M.P., Welch, J., Muilenburg, A., and Willing, M.C. (2011). Clinical insights gained from eight new cases and review of reported cases with Jeune syndrome (asphyxiating thoracic dystrophy). *Am J Med Genet A* 155A, 1021-1032.

Konstantinidou, A.E., Fryssira, H., Sifakis, S., Karadimas, C., Kaminopetros, P., Agrogiannis, G., Velonis, S., Nikkels, P.G., and Patsouris, E. (2009). Cranioectodermal dysplasia: a probable ciliopathy. *Am J Med Genet A* 149A, 2206-2211.

Kozminski, K.G., Beech, P.L., and Rosenbaum, J.L. (1995). The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol* 131, 1517-1527.

Labrune, P., Fabre, M., Trioche, P., Estournet-Mathiaud, B., Grangepon, M.C., Rambaud, C., Maurage, C., and Bernard, O. (1999). Jeune syndrome and liver disease: report of three cases treated with ursodeoxycholic acid. *Am J Med Genet* 87, 324-328.

Lander, E.S., and Botstein, D. (1987). Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236, 1567-1570.

Leitch, C.C., Zaghloul, N.A., Davis, E.E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., Alfadhel, M., Lewis, R.A., Eyaid, W., Banin, E., *et al.* (2008). Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40, 443-448.

Levin, L.S., Perrin, J.C., Ose, L., Dorst, J.P., Miller, J.D., and McKusick, V.A. (1977). A heritable syndrome of craniosynostosis, short thin hair, dental abnormalities, and short limbs: cranioectodermal dysplasia. *J Pediatr* 90, 55-61.

Liu, A., Wang, B., and Niswander, L.A. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* 132, 3103-3111.

Locker, D., Berka, E., Jokovic, A., and Tompson, B. (2007). Does self-weighting of items enhance the performance of an oral health-related quality of life questionnaire? *Community Dent Oral Epidemiol* 35, 35-43.

Mainzer, F., Saldino, R.M., Ozonoff, M.B., and Minagi, H. (1970). Familial nephropathy associated with retinitis pigmentosa, cerebellar ataxia and skeletal abnormalities. *Am J Med* 49, 556-562.

Majewski, F., Pfeiffer, R.A., Lenz, W., Muller, R., Feil, G., and Seiler, R. (1971). [Polysyndactyly, short limbs, and genital malformations--a new syndrome?]. *Z Kinderheilkd* 111, 118-138.

Mandl, L., and Megele, R. (1989). Primary cilia in normal human neocortical neurons. *Z Mikrosk Anat Forsch* 103, 425-430.

Mathe, E., Olivier, M., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., and Tavtigian, S.V. (2006). Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 34, 1317-1325.

May, S.R., Ashique, A.M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., and Peterson, A.S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* 287, 378-389.

Meizner, I., and Barnhard, Y. (1995). Short-rib polydactyly syndrome (SRPS) type III diagnosed during routine prenatal ultrasonographic screening. A case report. *Prenat Diagn* 15, 665-668.

Merrill, A.E., Merriman, B., Farrington-Rock, C., Camacho, N., Sebald, E.T., Funari, V.A., Schibler, M.J., Firestein, M.H., Cohn, Z.A., Priore, M.A., *et al.* (2009). Ciliary abnormalities due to defects in the retrograde transport protein DYNC2H1 in short-rib polydactyly syndrome. *Am J Hum Genet* 84, 542-549.

Mill, P., Lockhart, P.J., Fitzpatrick, E., Mountford, H.S., Hall, E.A., Reijns, M.A., Keighren, M., Bahlo, M., Bromhead, C.J., Budd, P., *et al.* (2011). Human and mouse mutations in WDR35 cause short-rib polydactyly syndromes due to abnormal ciliogenesis. *Am J Hum Genet* 88, 508-515.

Naumoff, P., Young, L.W., Mazer, J., and Amortegui, A.J. (1977). Short rib-polydactyly syndrome type 3. *Radiology* 122, 443-447.

Nogales-Cadenas, R., Abascal, F., Diez-Perez, J., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2009). CentrosomeDB: a human centrosomal proteins database. *Nucleic Acids Res* 37, D175-180.

Oberklaid, F., Danks, D.M., Mayne, V., and Campbell, P. (1977). Asphyxiating thoracic dysplasia. Clinical, radiological, and pathological information on 10 patients. *Arch Dis Child* 52, 758-765.

Ocbina, P.J., Eggenschwiler, J.T., Moskowitz, I., and Anderson, K.V. (2011). Complex interactions between genes controlling trafficking in primary cilia. *Nat Genet* 43, 547-553.

Pan, J., and Snell, W. (2007). The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* 129, 1255-1257.

Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Cole, D.G. (2000). *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151, 709-718.

Perrault, I., Saunier, S., Hanein, S., Filhol, E., Bizet, A.A., Collins, F., Salih, M.A., Gerber, S., Delphin, N., Bigot, K., *et al.* (2012). Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am J Hum Genet* 90, 864-870.

Piperno, G., Siuda, E., Henderson, S., Segil, M., Vaananen, H., and Sassaroli, M. (1998). Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J Cell Biol* 143, 1591-1601.

Poole, C.A., Flint, M.H., and Beaumont, B.W. (1985). Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil* 5, 175-193.

Poole, C.A., Jensen, C.G., Snyder, J.A., Gray, C.G., Hermanutz, V.L., and Wheatley, D.N. (1997). Confocal analysis of primary cilia structure and colocalization with the Golgi apparatus in chondrocytes and aortic smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 21, 483-494.

Poole, C.A., Zhang, Z.J., and Ross, J.M. (2001). The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J Anat* 199, 393-405.

Putoux, A., Thomas, S., Coene, K.L., Davis, E.E., Alanay, Y., Ogur, G., Uz, E., Buzas, D., Gomes, C., Patrier, S., *et al.* (2011). KIF7 mutations cause fetal hydrolethrus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet* 43, 601-606.

Qin, J., Lin, Y., Norman, R.X., Ko, H.W., and Eggenschwiler, J.T. (2011). Intraflagellar transport protein 122 antagonizes Sonic Hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1456-1461.

Reiter, J.F., and Skarnes, W.C. (2006). Tectonic, a novel regulator of the Hedgehog pathway required for both activation and inhibition. *Genes Dev* 20, 22-27.

Ring, E., Zobel, G., Ratschek, M., Trop, M., and Wendler, H. (1990). Retrospective diagnosis of Jeune's syndrome in two patients with chronic renal failure. *Child Nephrol Urol* 10, 88-91.

Robinson, P.N., Krawitz, P., and Mundlos, S. (2011). Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clin Genet* 80, 127-132.

Ross, A.J., Dailey, L.A., Brighton, L.E., and Devlin, R.B. (2007). Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 169-185.

Ross, A.J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S., *et al.* (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37, 1135-1140.

Ruiz-Perez, V.L., Blair, H.J., Rodriguez-Andres, M.E., Blanco, M.J., Wilson, A., Liu, Y.N., Miles, C., Peters, H., and Goodship, J.A. (2007). Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development* 134, 2903-2912.

Ruiz-Perez, V.L., Ide, S.E., Strom, T.M., Lorenz, B., Wilson, D., Woods, K., King, L., Francomano, C., Freisinger, P., Spranger, S., *et al.* (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodermal dysostosis. *Nat Genet* 24, 283-286.

Saldino, R.M., and Noonan, C.D. (1972). Severe thoracic dystrophy with striking micromelia, abnormal osseous development, including the spine, and multiple visceral anomalies. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 114, 257-263.

Sasindran, S.J., Saikolappan, S., and Dhandayuthapani, S. (2007). Methionine sulfoxide reductases and virulence of bacterial pathogens. *Future Microbiol* 2, 619-630.

Satir, P. (1995). Landmarks in cilia research from Leeuwenhoek to us. *Cell Motil Cytoskeleton* 32, 90-94.

Satir, P., and Christensen, S.T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69, 377-400.

Scholey, J.M., and Anderson, K.V. (2006). Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell* 125, 439-442.

Sensenbrenner, J.A., Dorst, J.P., and Owens, R.P. (1975). New syndrome of skeletal, dental and hair anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11, 372-379.

Shalom, O., Shalva, N., Altschuler, Y., and Motro, B. (2008). The mammalian Nek1 kinase is involved in primary cilium formation. *FEBS Lett* 582, 1465-1470.

Silengo, M.C., Cavallaro, S., and Franceschini, P. (1978). Recessive spondylocostal dysostosis: two new cases. *Clin Genet* 13, 289-294.

Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., *et al.* (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* 37, 537-543.

St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13, 2072-2086.

Stottmann, R.W., Tran, P.V., Turbe-Doan, A., and Beier, D.R. (2009). Ttc21b is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Dev Biol* 335, 166-178.

Terwilliger, J.D., and Ott, J. (1993). A novel polylocus method for linkage analysis using the lod-score or affected sib-pair method. *Genet Epidemiol* 10, 477-482.

Terwilliger, T.C. (1994). MAD phasing: Bayesian estimates of F(A). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 11-16.

Thiel, C., Kessler, K., Giessler, A., Dimmler, A., Shalev, S.A., von der Haar, S., Zenker, M., Zahnleiter, D., Stoss, H., Beinder, E., *et al.* (2011). NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. *Am J Hum Genet* 88, 106-114.

Thomas, S., Legendre, M., Saunier, S., Bessieres, B., Alby, C., Bonniere, M., Toutain, A., Loeuillet, L., Szymanska, K., Jossic, F., *et al.* (2012). TCTN3 Mutations Cause Mohr-Majewski Syndrome. *Am J Hum Genet* 91, 372-378.

Tienari, P.J., Terwilliger, J.D., Ott, J., Palo, J., and Peltonen, L. (1994). Two-locus linkage analysis in multiple sclerosis (MS). *Genomics* 19, 320-325.

Tobe, K., Tsuchiya, T., Itoshima, T., Nagashima, H., and Kobayashi, T. (1985). Electron microscopy of fat-storing cells in liver diseases with special reference to cilia and cytoplasmic cholesterol crystals. *Arch Histol Jpn* 48, 435-441.

Tompson, S.W., Ruiz-Perez, V.L., Blair, H.J., Barton, S., Navarro, V., Robson, J.L., Wright, M.J., and Goodship, J.A. (2007). Sequencing EVC and EVC2 identifies mutations in two-thirds of Ellis-van Creveld syndrome patients. *Hum Genet* 120, 663-670.

Tran, P.V., Haycraft, C.J., Besschetnova, T.Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R.W., Herron, B.J., Chesebro, A.L., Qiu, H., Scherz, P.J., Shah, J.V., *et al.* (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet* 40, 403-410.

Tuysuz, B., Baris, S., Aksoy, F., Madazli, R., Ungur, S., and Sever, L. (2009). Clinical variability of asphyxiating thoracic dystrophy (Jeune) syndrome: Evaluation and classification of 13 patients. *Am J Med Genet A* 149A, 1727-1733.

Upadhyay, P., Birkenmeier, E.H., Birkenmeier, C.S., and Barker, J.E. (2000). Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 217-221.

Veland, I.R., Awan, A., Pedersen, L.B., Yoder, B.K., and Christensen, S.T. (2009). Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 111, p39-53.

Vogler, C., Homan, S., Pung, A., Thorpe, C., Barker, J., Birkenmeier, E.H., and Upadhyay, P. (1999). Clinical and pathologic findings in two new allelic murine models of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 10, 2534-2539.

Walczak-Sztulpa, J., Eggenschwiler, J., Osborn, D., Brown, D.A., Emma, F., Klingenberg, C., Hennekam, R.C., Torre, G., Garshasbi, M., Tzsach, A., *et al.* (2010). Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner syndrome, is a ciliopathy caused by mutations in the IFT122 gene. *Am J Hum Genet* 86, 949-956.

Warman, M.L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Lachman, R., LeMerrer, M., Mortier, G., Mundlos, S., Nishimura, G., Rimoin, D.L., *et al.* (2011). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 155A, 943-968.

Wei, Q., Wang, L., Wang, Q., Kruger, W.D., and Dunbrack, R.L., Jr. (2010). Testing computational prediction of missense mutation phenotypes: functional characterization of 204 mutations of human cystathionine beta synthase. *Proteins* 78, 2058-2074.

Wemmer, K.A., and Marshall, W.F. (2007). Flagellar length control in *Chlamydomonas*--paradigm for organelle size regulation. *Int Rev Cytol* 260, 175-212.

White, M.C., and Quarumby, L.M. (2008). The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol* 9, 29.

Wu, M.H., Kuo, P.L., and Lin, S.J. (1995). Prenatal diagnosis of recurrence of short rib-polydactyly syndrome. *Am J Med Genet* 55, 279-284.

Yamamoto, M., and Kataoka, K. (1986). Electron microscopic observation of the primary cilium in the pancreatic islets. *Arch Histol Jpn* 49, 449-457.

Yan, C.Q., Qian, K.X., Yan, Q.S., Zhang, X.Q., Xue, G.P., Huangfu, W.G., Wu, Y.F., Zhao, Y.Z., Xue, Z.Y., Huang, J., *et al.* (2004). Use of asymmetric somatic hybridization for transfer of the bacterial blight resistance trait from *Oryza meyeriana* L. to *O. sativa* L. ssp. *japonica*. *Plant Cell Rep* 22, 569-575.

Zaghloul, N.A., and Katsanis, N. (2010). Functional modules, mutational load and human genetic disease. *Trends Genet* 26, 168-176.